

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TESIS DOCTORAL

**Identificación de los factores epigenéticos en el cáncer
papilar de tiroides y su correlación clínica**

TESIS DOCTORAL

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Hidalgo García

Director:

Jesús Álvarez Fernández-Represa

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-8256-1

© Ana Hidalgo García, 2010



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía

**IDENTIFICACIÓN DE FACTORES EPIGENÉTICOS
EN EL CÁNCER PAPILAR DE TIROIDES Y SU
CORRELACIÓN CLÍNICA**

TESIS DOCTORAL

ANA HIDALGO GARCÍA

MADRID, 2010

A mis padres

AGRADECIMIENTOS:

A mis directores de tesis por su labor científica, dedicación y eficacia al prestarme su ayuda y apoyo moral en todo momento:

Al Dr. Manuel Hidalgo Pascual, Jefe de Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo “B” del Hospital Universitario 12 de Octubre y Profesor Titular de Cirugía de la Universidad Complutense de Madrid, por su apoyo e interés mostrado durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

Al Dr. Eduardo Ferrero Herrero, Profesor Asociado de Cirugía (Facultad de Medicina de la UCM), y cirujano Adjunto del Servicio de Cirugía y del Aparato Digestivo “B” del Hospital Universitario 12 de Octubre, por su interés, su insistencia, su entusiasmo y su inestimable ayuda en cada paso de este trabajo.

A Neocodex y su Departamento de Genómica Estructural, en especial a los doctores Agustín Ruiz, Reposo Ramírez-Lorca, José Luis Royo y Enrique Vázquez; sin su ayuda no se hubiera llevado a cabo el estudio genético

A la Unidad de Investigación-Epidemiología Clínica del Hospital Universitario 12 de Octubre (Dr. Agustín Gómez de la Cámara y David Lora Pablos) por su colaboración en la elaboración del análisis estadístico.

Al Servicio de Anatomía Patológica y Comisión de Tumores del Hospital Universitario 12 de Octubre por su aportación en el proceso de recogida de datos.

Al Dr. Francisco Javier Fernández Martínez, del Departamento de Genética del Hospital 12 de Octubre que ha colaborado en la elaboración y composición de diferentes términos generales.

A mi familia por el gran apoyo y comprensión que siempre muestra en cada paso que doy.

A mis compañeros y amigos por acompañarme y animarme en todo momento.

A la Fundación Médica Mutua Madrileña por la ayuda facilitada para la realización de la tesis.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	13
INTRODUCCIÓN	15
1.- ASPECTOS HISTÓRICOS DEL TIROIDES	16
2.- EMBRIOLOGÍA Y ANATOMÍA DEL TIROIDES	21
2.1.- EMBRIOLOGÍA	21
2.2.- ANATOMÍA	24
3.- FUNCIONAMIENTO DEL TIROIDES	34
4.- CONCEPTOS DE GENÉTICA Y EPIGENÉTICA	38
4.1.- INTRODUCCIÓN	38
4.2.- ALGUNOS CONCEPTOS BÁSICOS DE GENÉTICA Y EPIGENÉTICA	39
4.3.- CAUSAS DE LA VARIACIÓN GENÉTICA	41
4.4.- ¿CÓMO SE ALMACENA LA INFORMACIÓN GENÉTICA EN EL DN?	43
4.5.- EPIGÉNESIS	45
5.- NÓDULO TIROIDEO	50
5.1.- INTRODUCCIÓN	50
5.2.- PREVALENCIA	51
5.3.- ETIOLOGÍA	51
5.4.- EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA	52
6.- TUMORES TIROIDEOS	60
6.1.- CLASIFICACIÓN	60
6.2.- INCIDENCIA Y MORTALIDAD	63
6.3.- ETIOPATOGENIA	65
6.4.- FORMAS ANATOMOCLÍNICAS	73
7.- CIRUGÍA TIROIDEA	84
7.1.- INTRODUCCIÓN	84
7.2.- ABORDAJE QUIRÚRGICO DEL TIROIDES Y SU SEGUIMIENTO	86
7.3.- LA DISECCIÓN GANGLIONAR DEL CUELLO	89
7.4.- CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIROIDES Y METÁSTASIS GANGLIONARES	94
7.5.- DISECCIÓN FUNCIONAL DEL CUELLO EN EL CDT	97
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS DE TRABAJO	103

OBJETIVOS	107
MATERIAL Y MÉTODOS	110
1.- GENERALIDADES	111
2.- MATERIAL Y MÉTODO	111
3.- TRATAMIENTO QUIRÚRGICO	113
4.- ESTUDIO GENÉTICO	115
4.1.- EXTRACCIÓN DEL ADN	115
4.2.- FABRICACION DE MICROARRAYS	116
4.3.- AMPLIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO MEDIANTE PCR	117
4.4.- SELECCIÓN DE MARCADORES	119
4.5.- GENOTIPO Y DESAJUSTE ALÉLICO: ANÁLISIS	122
5.- EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO	123
RESULTADOS	126
A.- ESTUDIO GENERAL SOBRE 109 PACIENTES CON CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIROIDES	127
B.- ESTUDIO GENÉTICO ESPECÍFICO SOBRE 41 PACIENTES CON CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES	140
DISCUSIÓN	167
CONCLUSIONES	185
BIBLIOGRAFÍA	188

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACTH:	corticotropina u hormona adrenocorticotrópica
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ARN:	ácido ribonucleico
ATA:	American Thyroid Association
CDT:	carcinoma diferenciado de tiroides
CLN:	disección central de ganglios linfáticos
CMT:	carcinoma medular de tiroides
CT:	carcinoma de tiroides
CTMP:	microcarcinoma papilar de tiroides
DTC:	carcinoma diferenciado de tiroides
FMTc:	carcinoma familiar medular de tiroides
FVPTC:	variante folicular del carcinoma papilar de tiroides
HT:	hemitiroidectomía
HD:	hemitiroidectomía derecha
HI:	hemitiroidectomía izquierda
Kb:	kilobite
LOH:	pérdida de heterocigosidad
LT4:	L-tiroxina
Mb:	megabite
MEN:	neoplasia endocrina múltiple
mRNA:	ácido ribonucleico mensajero
NCCN:	National Comprehensive Cancer Network
PAAF:	punción aspiración con agua fina
PTC:	carcinoma papilar de tiroides
Sistema APUD:	amine precursor uptake and decarboxilation
SNC:	sistema nervioso central
SNP:	polimorfismo de nucleótido único
TAC:	tomografía axial computerizada
TG:	tiroglobulina sérica

TSH:	hormona tiotropina
T ₃ :	hormona triyodotironina
T ₄ :	hormona tiroxina
TT:	tiroidectomía total
TCT:	tiroidectomía casi total

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1 Dibujo esquemático de la embriología del Tiroides	20
Figura 2 Esquema embriológico del Tiroides	21
Figura 3 Desarrollo del Tiroides Primitivo	22
Figura 4 Esquema de la embriología de la glándula paratiroides	23
Figura 5 Musculatura de la región laterocervical del cuello	24
Figura 6 Vascularización venosa del cuello	25
Figura 7 Vascularización arterial del cuello	27
Figura 8 Nervios recurrentes	29
Figura 9 Nervios laríngeos	30
Figura 10 Localización de las glándulas paratiroides superiores	31
Figura 11 Localización de las glándulas paratiroides inferiores	32
Figura 12 Regulación del sistema hipotálamo-hipofisario-tiroideo	35
Figura 13 Esquema sobre la división celular	44
Figura 14 Histología del Carcinoma Papilar	73
Figura 15 Histología del Carcinoma Folicular	77
Figura 16 Compartimentos linfáticos del cuello	90
Figura 17 Descripción anatómica de los triángulos del cuello	91
Figura 18 Clasificación del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center	92
Figura 19 Incisión en “L” de Paul Ander	98
Figura 20 La pinza señala el conducto torácico	100
Figura 21 Máquina de Extracción de ADN	115
Figura 22 Representación gráfica de la zona genómica ampliada donde se encuentran los loci estudiados	119
Figura 23 Bases moleculares de la reacción de Pirosecuenciación	121
Figura 24 Diagrama de sectores representando la lateralidad de la ecografía	128
Figura 25 Diagrama sobre estadio respecto al sexo	133
Figura 26 Diagrama de distribución de frecuencias según el	134

	estadio	
Figura 27	Diagrama de barras que representa el estadio y tiempos de realización de cirugía	135
Figura 28	Diagrama de barras que representa estadio y tipo de cirugía	135
Figura 29	Diagrama de barras que representa el estadio respecto a la AP	136
Figura 30	Correspondencia entre el gen EMSYi17CG y los 4 estadios	152
Figura 31	Correspondencia entre polimorfismo EMSYi17CG_A y estadios	153
Figura 32	Correspondencia del los polimorfismos del gen EMSY y los estadios	154
Figura 33	Análisis de correspondencia entre el polimorfismo CAPN5UT4 y los estadios	155
Figura 34	Análisis de correspondencia entre CAPN5i10 y estadios	156
Figura 35	Análisis de correspondencia entre CAPN5i12 y estadios	157
Figura 36	Correspondencia múltiple entre los 3 polimorfismos del gen CAPN5 y los estadios en dimensiones 1 y 2	158
Figura 37	Correspondencia múltiple del gen CAPN5 y los estadios en las dimensiones 1 y 3	158
Figura 38	Correspondencia entre el polimorfismo PAK162CT y los estadios	159
Figura 39	Correspondencia entre el polimorfismo PAK136AG y los estadios	160
Figura 40	Correspondencia entre el polimorfismo PAK170CT y los 4 estadios	161
Figura 41	Correspondencia múltiple entre el gen PAK y los estadios en las dimensiones 1 y 2	162
Figura 42	Correspondencia múltiple entre el gen PAK y los estadios en las dimensiones 1 y 3	162

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla 1 Etiología de la enfermedad nodular tiroidea	51
Tabla 2 Factores asociados a malignidad	53
Tabla 3 Ventajas e inconvenientes de la PAAF	55
Tabla 4 Clasificación Clásica de los Tumores Tiroideos	59
Tabla 5 Clasificación de los Tumores Tiroideos (OMS, 1988)	60
Tabla 6 Clasificación Tumores Tiroideos 2007	60
Tabla 7 Clasificación TNM y estadio del carcinoma tiroideo	61
Tabla 8 Estadaje de los tumores papilares de tiroides	62
Tabla 9 Factores de riesgo del carcinoma diferenciado de tiroides	94
Tabla 10 Distribución de frecuencias según edad mayor o menor de 45 años	126
Tabla 11 Distribución de frecuencia según sexo	127
Tabla 12 Distribución de pacientes según pruebas tiroideas funcionales	127
Tabla 13 Distribución de pacientes según el lugar donde se realizó la PAAF	128
Tabla 14 Distribución de frecuencias y PAAF preoperatorio	129
Tabla 15 Distribución de pacientes según el tipo de cirugía realizada	130
Tabla 16 Distribución de frecuencias y tiempos de cirugía	130
Tabla 17 Comparativa de resultados histológicos con la PAAF preoperatoria	131
Tabla 18 Existencia de invasión capsular	132
Tabla 19 Existencia de invasión vascular	132
Tabla 20 Existencia de ganglios linfáticos afectados	133
Tabla 21 Estadio e invasión capsular	137
Tabla 22 Estadio e invasión vascular	137
Tabla 23 Distribución de edad en 41 pacientes	138
Tabla 24 Distribución de sexo en 41 pacientes con estudio genético	139

Tabla 25	Tipo de cirugía en los 41 pacientes del estudio genético	139
Tabla 26	Afectación ganglionar en 41 pacientes	140
Tabla 27	Media de cuantificación alélica en muestras de sangre periférica	142
Tabla 28	Comparación de Media de intensidades alélicas entre control y tejido tumoral	144
Tabla 29	Comparación de la frecuencia de los haplotipos de los genes EMSY, CAPN5 y PAK1 entre pacientes con cáncer papilar de tiroides y población general española	146
Tabla 30	Frecuencia de estadios en los 41 pacientes	146
Tabla 31	Genotipos de los 3 polimorfismos del gen EMSY; a) genotipo del polimorfismo EMSYi17CG; b) genotipo del polimorfismo EMSY860AC; c) genotipo del polimorfismo EMSY17CG_A	147
Tabla 32	Genotipos de los 3 polimorfismos del gen CAPN5; a) genotipo del polimorfismo CAPN5UT; b) genotipo del polimorfismo CAPN5I10; c) genotipo del polimorfismo CAPN5I12	148
Tabla 33	Genotipos de los 3 polimorfismos del gen APK; a) genotipo del polimorfismo APK162CT; b) genotipo del polimorfismo PAK136AG; c) genotipo del polimorfismo PAK170CT	149
Tabla 34	Distribución de genes según estadio	150

INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS HISTÓRICOS DEL TIROIDES

Existen documentos procedentes de la más remota antigüedad, que hacen referencia a la existencia de tumores tiroideos (Langer P, 1961). Los médicos chinos e hindúes ya conocían, varios siglos antes de la era cristiana, la existencia de estos tumores y dejaron constancia de ello en algunos escritos que han llegado hasta nuestros días. El autor chino Shan Khai Tsing relata en alguno de sus escritos la presencia de anomalías morfológicas en el cuello y lo relacionaba con la calidad del agua, proponiendo tratamiento con algas.

En el siglo III en la India, es preciso mencionar y destacar el friso de Gandhara donde se observa una figura de un sujeto portador de un bocio perturbando la paz de Budha (Mornex R, 1999).

En la civilización egipcia, donde la ciencia y en especial la medicina, alcanzó gran esplendor, se mencionaba el aumento de la glándula tiroides. Se conservan en la actualidad relieves procedentes de las culturas precolombinas andinas, donde se observan detalles que sugieren la existencia de tumores tiroideos (Patiño JF, 1976).

Hipócrates (siglo IV a. C) reseña en su obra el aumento de la glándula tiroides denominándolo “Joiron”. Claudio Galeno, médico griego que vivió en Roma en el siglo II D.c., ya hace referencia a la glándula tiroides en su obra “De Voce”, donde describe una intervención por bocio para desplazarlo sin realizar exéresis y preservando los nervios laríngeos recurrentes (Werner Sc, 1977).

Gayo Segundo Plinio, naturalista y filósofo latino del siglo I D.c. en su extensa obra de la Historia Natural, describe el aumento del tiroides y lo llama “guttur”, llegando a sospechar que la causa de ese aumento era el agua que bebían (Langer P, 1961).

La Edad Media se caracteriza por un importante ambiente de superstición y miedo entorno a la glándula tiroides. Paracelso, médico y alquimista nacido a finales del S XV, relacionaba el aumento de esta glándula con la carencia de minerales en el agua que consumían las personas afectas.

La primera referencia de la época moderna a la glándula tiroides, la hace Vesalio a mediados del siglo XVI, realizando una detallada descripción anatómica. En el siglo XVII, Wharton, comenzó a denominar a la glándula tiroides con este nombre, tomando la palabra griega “**tireos**”, que significa “**escudo**”, dada la semejanza que presentaba con este objeto (Kaplan EL, 1987).

Prácticamente hasta el Renacimiento y la expansión de la investigación del cuerpo humano, la glándula tiroides no fue identificada como tal, probablemente por Leonardo Da Vinci sobre el año 1500 y definitivamente por Vesalio en 1543, llamándole “glándulas laríngeas”. Hacia el comienzo del 1600, los anatomistas finalmente identificaron la glándula en humanos. La primera descripción anatómica del tiroides se atribuye a Giulio Caserio de Papua en 1601. Más tarde la glándula recibió el nombre de “tiroides” por Thomas Wharton en 1656. Los experimentos de extirpación de tiroides fueron al principio erróneamente interpretados, debido a la extirpación simultánea de las paratiroides.

La primera tiroidectomía de la que existe constancia fue realizada por Paulus hacia el año 500 D.c., aunque fue el médico y escritor árabe Abul Casem Khalaf Ebn Abbas o Abul Quasim al-Zahrawi más conocido como Albucasis (Halsted WS, 1928), quien realizó la primera tiroidectomía con éxito de la que existe constancia histórica (Sedgwick CE, 1978), hacia el año 952 D.c., en la ciudad de Zahra (Córdoba) (Harrison TS. Tiroides, 1988). A finales del siglo XVIII, se realizaron algunas tiroidectomías de la mano de cirujanos como Desault y Hedenus (Kaplan EL, 1987), aunque en esta época existía un temeroso respeto por la glándula tiroides, debido a las importantes complicaciones que conllevaba su abordaje quirúrgico (Halsted WS, 1928).

En 1791 se recoge una de las primeras tiroidectomías parciales, realizada por el famoso cirujano francés Pierre Joseph Desault, para el tratamiento de una mujer con cáncer de tiroides en el Hotel Dieu de Paris (Desault PJ, 1792). En 1807, el Dr. Charles Harris de Nueva York operó un bocio gigante con éxito a través de una extensa incisión mediana vertical.

Antes de 1850 aproximadamente, se habían descrito tan sólo la realización de unas 70 tiroidectomías, con una mortalidad del 41% ya que estas intervenciones se llevaron a cabo antes de la anestesia endotraqueal, la utilización rutinaria de hemostatos, transfusión sanguínea, el concepto de la asepsia quirúrgica y antes de que existieran quirófanos en la mayoría de Hospitales (Süskind A, 1877).

No se produjeron avances significativos hasta finales del siglo XIX, cuando llegó el desarrollo de la anestesia general por JC Warren en 1846. Destaca Theodor Emil Kocher (1841-1917), profesor de cirugía de Berna, que llegó a realizar más de cinco mil tiroidectomías en su clínica (Harrison TS, 1988). Por su inestimable contribución al conocimiento de las enfermedades del tiroides y al progreso de la técnica quirúrgica de abordaje del mismo, recibió en 1909 el Premio Nobel de Medicina.

La aparición de los conceptos de antisepsia, iniciados por Joseph Lister (1827-1912) y la mejora de las técnicas anestésicas, iniciadas por William Thomas Morton (1819-1868) en 1846, contribuyeron al progreso de la cirugía del tiroides (Harrison TS, 1988). Con la aplicación de principios novedosos como la manipulación meticulosa, la identificación del nervio recurrente laríngeo y la conservación de las glándulas paratiroides, por entonces aún desconocidas, se logró reducir la mortalidad de una manera notable (Sedgwick CE, 1978).

Fue el propio Kocher quien descubrió que la exéresis total del tiroides provocaba mixedema, lo que evitaba si se realizaba tiroidectomía subtotal (Harrison TS, 1988).

La obra de Kocher fue continuada por Halsted, que desarrolló su propia técnica de tiroidectomía, recogida en su obra **“La historia quirúrgica del Bocio”** (Halsted WS, 1928). Así pues, fueron Kocher y Billroth en Europa y Halsted, Mayo, Crile y Lahey en los Estados Unidos, los impulsores de una auténtica revolución en la cirugía del tiroides. En 1880, Billroth era el cirujano con más experiencia en tiroides en el mundo. A Theodor Kocher de Berna, se le atribuye la maduración de la perspicacia quirúrgica que permitió un correcto abordaje del tiroides; adquirió rápidamente una amplia experiencia en cirugía tiroidea, que fue comunicando con trabajos sucesivos durante más de 40 años; fue refinando y mejorando su técnica y en 1895 su tasa de mortalidad para patología tiroidea benigna era menor del 1%. En 1917, hizo su última aparición en un Congreso Quirúrgico en Suiza, revisando su experiencia quirúrgica en cirugía de tiroides, enumerando aproximadamente una 5000 intervenciones con una tasa de mortalidad del 0.5%.

Especial importancia en el tratamiento de las enfermedades del tiroides, han tenido los avances en el conocimiento de su fisiología. Jean Louis Reverdin (1842-1929) en 1882 produjo de manera experimental un mixedema en pacientes que se sometían a tiroidectomía (Kaplan EL, 1987). A este cirujano suizo se debe la diferenciación entre la cápsula tiroidea aponeurótica de la anatómica. En 1896, Bernard Riedel (1846-1916) separó como patología las tiroiditis crónicas, completadas por Hakaru Hashimoto (1881-1934) en 1912 con la descripción de la tiroiditis linfocitaria.

En 1880, Paul Tillaux (1834-1904) realizó la ablación de la glándula tiroides de un paciente afecto de “bocio exoftálmico”, mejorando su sintomatología (Fragu P, 1999). Thomas Peel Dunhill nació en 1876 en Australia. En 1907 realizó su primera lobectomía tiroidea bajo anestesia local para el tratamiento de un bocio tóxico. En 1908 propuso que para el éxito en el tratamiento del bocio tóxico era necesaria la exéresis de bastante tejido tiroideo, defendiendo la exéresis bilateral del tiroides, antes de que lo hiciera Kocher (Dunhill T P, 1999)

Es célebre la experiencia de Murria, médico inglés, que en 1891 administró un extracto glicerinado de tiroides a los pacientes con mixedema, observando que mejoraban de este cuadro. Cinco años más tarde, Baumann detectó la presencia de gran cantidad de yodo en un hidrolizado ácido de extracto tiroideo, y trece años después, Oswald aisló la yodotiroglobulina, un compuesto formado por una base proteínica a la que encontraba unido el yodo.(Harrison TS, 1988). La tirosina fue aislada por primera vez por Kendall en 1915(Kaplan EL, 1987) y en 1927, Harrington y Barker lograron sintetizarla. Gross, Pitt-Rivers, Roche, Lissitsky y Michel, a partir de 1953, contribuyeron notablemente al conocimiento de las hormonas sintetizadas en el tiroides.

En 1943 McKenzies y Astwood, descubrieron el tiouracilo, abriendo el importante camino hacia los antitiroideos, lo que permitía el tratamiento del bocio y el control de una de las más temidas complicaciones de la cirugía del tiroides, que era la tirotoxicosis.

Dentro de la literatura de habla hispana, hemos de resaltar varios autores: Esquerdo en Palma de Mallorca en 1891 que propone el tratamiento quirúrgico para la enfermedad de Basedow. En Hispanoamérica destaca en Méjico, Ortiz que describe la tiroidectomía total en dos tiempos (1893). En Cuba, Menocalque realiza una enucleación de un bocio lateral (1893). En Argentina, Masi publica un caso de enucleación de un bocio quístico por la técnica de Botín (1899)

2. EMBRIOLOGÍA Y ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA TIROIDES

2.1.- EMBRIOLOGÍA (Sadler T, 1986) (Sanders L, 1997)

Para la realización de la cirugía de la glándula tiroides se necesitan conocer los fundamentos básicos del desarrollo embriológico de la misma, para entender las variaciones topográficas y poder realizar una cirugía correcta.

Lo más característico del desarrollo embrionario de la cabeza y el cuello es la formación de los arcos branquiales o faríngeos que aparecen entre la cuarta y quinta semana del desarrollo intrauterino. Estos arcos están separados por profundos surcos llamados hendiduras.

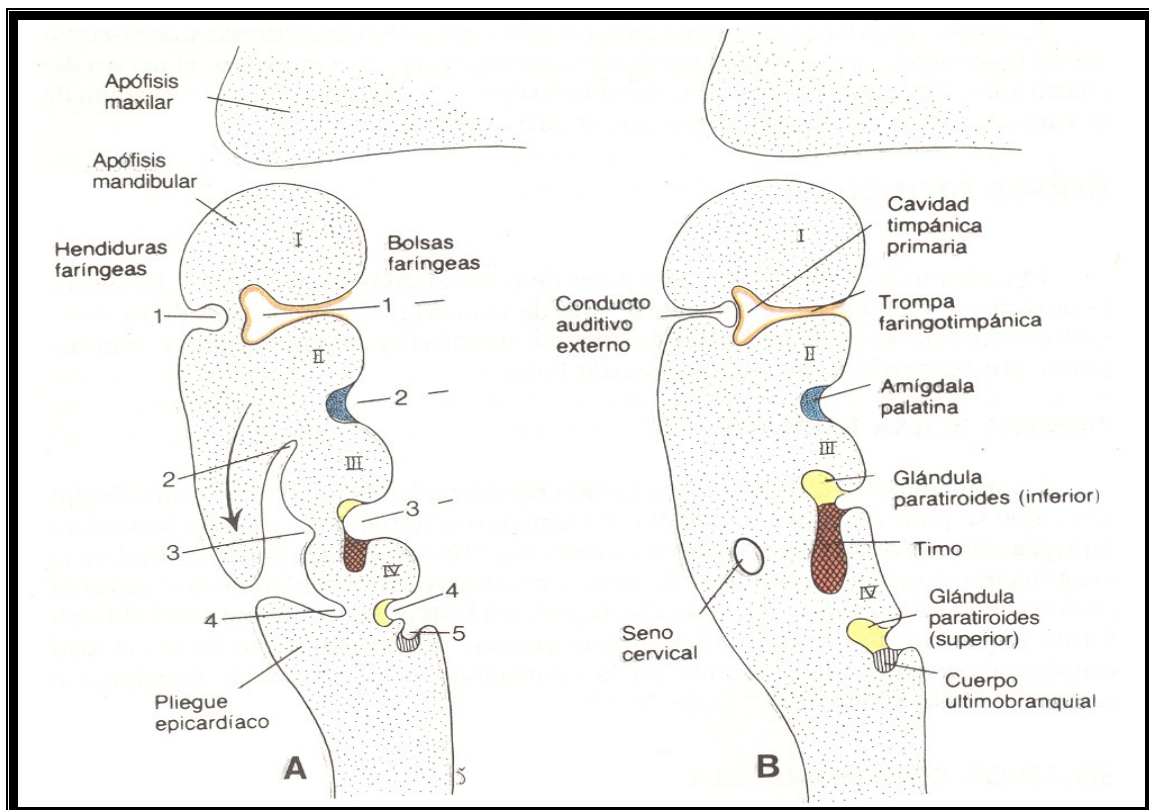


Figura 1. Dibujo esquemático de la embriología del Tiroides

Del primer arco branquial surgirán la mandíbula y partes del oído medio. Del segundo arco, entre otras estructuras, se formará el asta menor y la porción superior del hueso hioides. Del tercer arco se origina la porción inferior del cuerpo del hioides y el asta superior del cartílago tiroides. Del cuarto y sexto arcos branquiales surgirán el resto del cartílago tiroides, cricoides, aritenoides y cuneiforme.

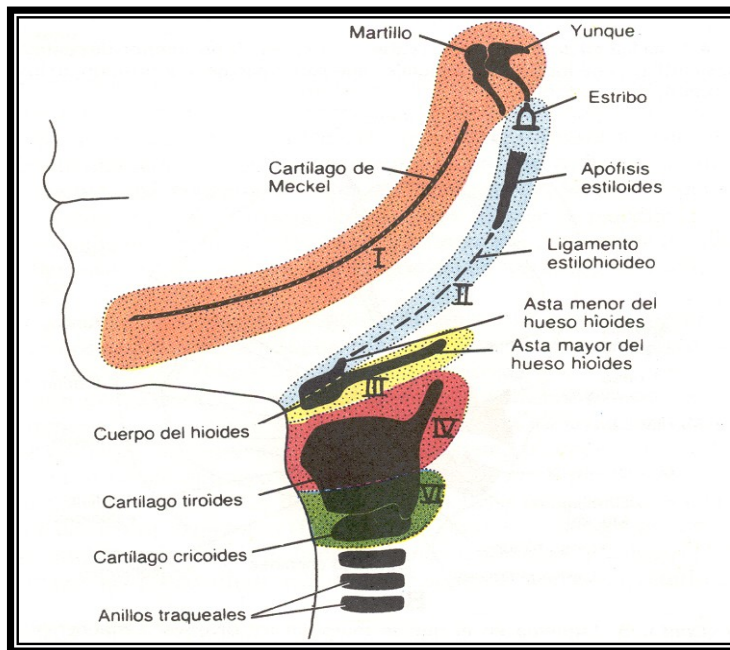


Figura 2. Esquema embriológico del Tiroides.

Cada arco branquial se halla innervado por un nervio diferente, siendo de gran importancia para entender la innervación en el adulto de las diferentes estructuras cervicales. Junto con el desarrollo de estos arcos y hendiduras aparecen unas evaginaciones llamadas bolsas

faríngeas a lo largo de las paredes del intestino anterior. Progresivamente estas bolsas se introducen en el mesénquima circundante pero sin llegar a comunicar con las hendiduras externas. Los arcos branquiales, en número de seis, serán determinantes para la formación de la cabeza y el cuello.

2.1.1. Glándula Tiroides

La glándula tiroides se origina de las células epiteliales en la línea media del suelo de la futura faringe. Cuando éste se engrosa, se produce un proceso de evaginación dando lugar al futuro tejido tiroideo. Siguiendo el camino de los grandes vasos y del corazón, el futuro tiroides desciende a lo largo del conducto tirogloso.

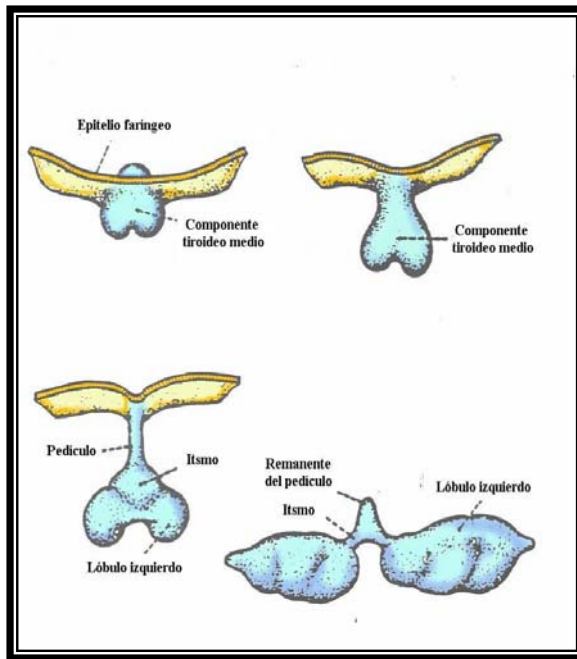


Figura 3. Desarrollo del Tiroides Primitivo

Este conducto se origina del agujero ciego de la base de la lengua. El tiroides primitivo se divide en dos lóbulos antes de situarse delante de la tráquea en la séptima semana embriológica adquiriendo la forma de “h” o escudo. La parte distal del conducto tirogloso puede formar el lóbulo piramidal aunque

normalmente el epitelio del conducto tirogloso degenera y desaparece. Muchas de las anomalías de la tiroides se deben a variaciones en el descenso de la misma en el periodo embrionario.

2.1.2. Glándulas Paratiroides (Wang C, 1976)

Las futuras glándulas paratiroides surgen de las células endodérmicas que proliferan de unas evaginaciones laterales de la tercera (paratiroides inferiores) y cuarta bolsa faríngeas (paratiroides superiores). De la parte ventral de la tercera bolsa además se formará el timo que migrará al mediastino arrastrando a las paratiroides inferiores. La cuarta bolsa y su futuro tejido paratiroideo va menos asociada a la migración del timo y más a la de los futuros lóbulos tiroideos. La parte ventral de la cuarta bolsa parece formar también parte del desarrollo de tejido tímico que sin embargo más tarde desaparece.

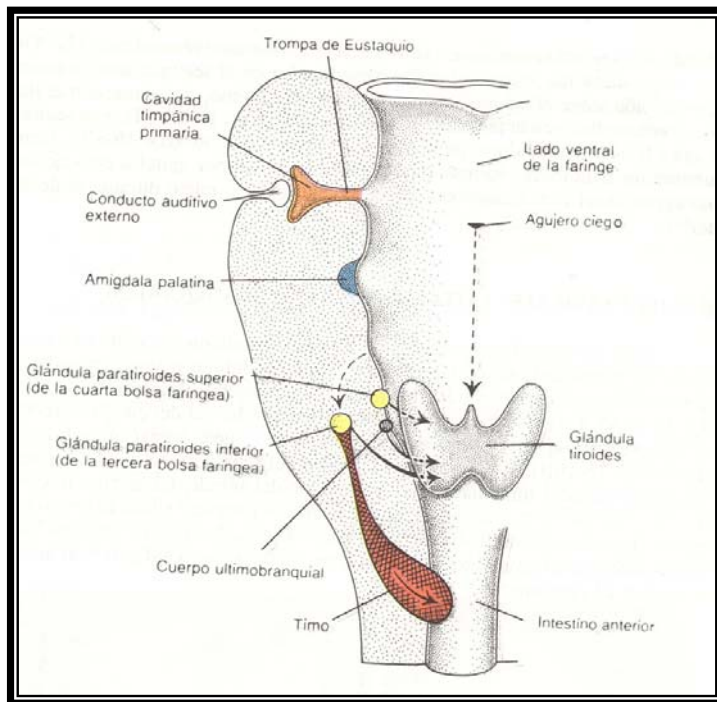


Figura 4. Esquema de la embriología de la glándula paratiroides

2.2.- ANATOMÍA DE LA REGIÓN TIROIDEA (Latarjed, 1983)

Cualquier cirujano que pretenda realizar intervenciones sobre el tiroides deben tener conocimientos acerca de la anatomía del cuello, que incluya la glándula tiroides, su irrigación e inervación, así como las estructuras anatómicas vecinas: tráquea y laringe.

2.1.1. Piel

La piel del cuello puede presentar pliegues transversos marcados que pueden indicar el lugar de la incisión: a través de los pliegues superiores a la línea esternoclavicular es el sitio idóneo para la incisión en collar.

2.2.2. Los Músculos

El **platisma**, es un delgado músculo en forma de sábana que se encuentra inmediatamente debajo del tejido subcutáneo. Se dispone en abanico por debajo de las clavículas hasta la mandíbula dejando una línea medial libre. Este músculo debe ser disecado junto con la piel y el tejido celular subcutáneo en el momento de la cirugía. De esta manera, se evita un sangrado innecesario, porque

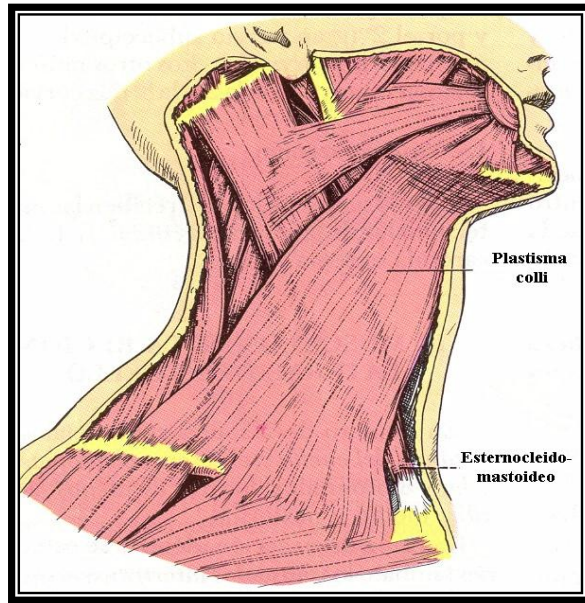


Figura 5. Musculatura laterocervical del cuello

el espacio entre el platisma y la fascia que cubre la musculatura pretiroidea es avascular.

Los músculos que deben ser tenidos en cuenta durante la cirugía tiroidea son los **esternocleidomastoideos**, que forman los límites laterales, el **esternohioideo** y el **esternotiroideo**, que forman el límite superficial y anterior. El esternohioideo se encuentra más anterior y el esternotiroideo justo debajo, cubriendo la cápsula tiroidea. Ambos nacen del esternón. El esternohioideo se inserta en el hioides y el esternotiroideo en el cartílago tiroides. La fascia del borde medial de la unión de los esternocleidomastoideos se fusiona con la fascia lateral de los esternohioideos. Esta fascia se divide verticalmente durante la exposición del tiroides permitiendo la retracción del músculo esternocleidomastoideo lateralmente. Los músculos esternohioideo y esternotiroideo están inervados por el asa del nervio hipogloso que desciende pegado al borde lateral del esternohioideo y entra en los músculos en la parte baja del cuello. Cuando estos músculos deban ser seccionados transversalmente debe hacerse en la parte más alta posible para preservar la función motora de ambos.

2.2.3. Los vasos: irrigación

Los principales vasos que irrigan la glándula tiroidea son externos a la cápsula. El principal aporte sanguíneo viene de las arterias tiroideas superior e inferior. Ocasionalmente una rama de la aorta o del tronco innominado llamada arteria tiroidea media y vena tiroidea media irrigan a la parte más caudal. Las venas drenan, en general, a través de las áreas de las correspondientes arterias.

2.2.3. a.- Las venas

La **venas yugulares superficiales** se encuentran debajo del platisma. Son fácilmente visibles y no suelen presentar problemas en la disección cervical. Las venas yugulares externas discurren lateralmente y cruzan por encima de los músculos esternocleidomastoideos. Entre las venas yugular anterior y externa puede haber un plexo venoso que en el caso

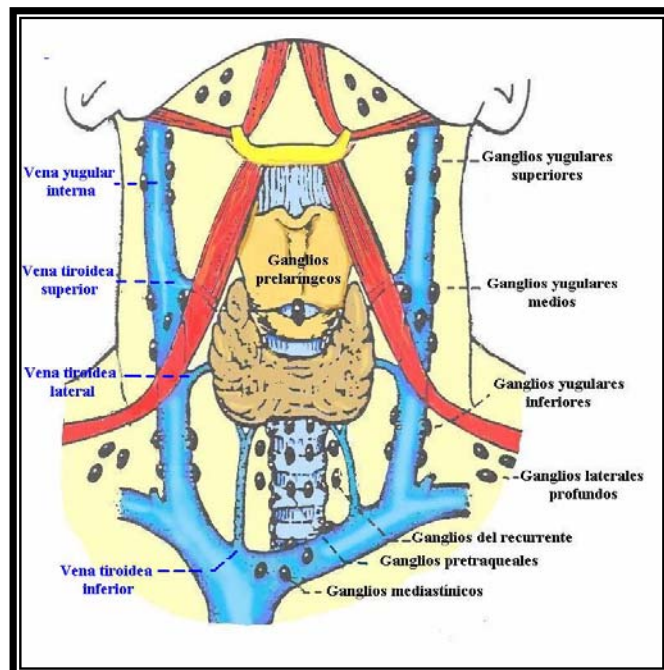


Figura 6. Vascularización Venosa del Cuello.

de bocios grandes puede alcanzar un tamaño considerable. Debemos tener cuidado cuando se realiza la disección de la piel y el platisma para no dañarlos. Si disecamos con cuidado la fascia entre el esternocleidomastoideo y el esternohioideo, las venas comunicantes pueden ser identificadas y ligadas sin problemas. La vena yugular externa puede ser retraída junto con el esternocleidomastoideo y la vena yugular anterior se liga y secciona cuando se seccionan los músculos tiroideos.

Las venas tiroideas profundas abandonan la glándula tiroidea junto con las arterias correspondientes en los polos superior e inferior y en el lateral de

la glándula. Las venas son menos constantes en número y tamaño que las arterias. Las venas profundas pueden ser un grave problema durante la cirugía tiroidea porque además de su gran número, son fácilmente lesionables, con la consiguiente hemorragia, sobre todo en los pacientes con un bocio grande subesternal. En estos pacientes, la clavícula puede actuar como torniquete provocando la dilatación e incremento de presión de las venas. Cuando ocurre una hemorragia incontrolada, el polo inferior y el componente subesternal del bocio deben ser extraídos rápidamente del mediastino. Liberar el efecto torniquete de la clavícula permite a las venas colapsarse y controlar el sangrado.

Las venas tiroideas superiores abandonan el polo superior del tiroides justo anterior y lateral a la arteria tiroidea superior, drenando al tronco venoso tirolinguofacial que depende de la vena yugular interna. Debe ligarse de manera independiente a la arteria durante la tiroidectomía.

Las venas laterales varían en número. Pasan directamente desde el borde lateral de los lóbulos a la vena yugular interna. Durante la tiroidectomía, debemos ligarlas para poder acceder al compartimento lateral. En las glándulas patológicamente grandes, la vena yugular y las venas tiroideas medias pueden estar comprimidas contra el tiroides y ser confundidas con venas de la cápsula tiroidea siendo difícil encontrar el plano entre el tiroides y la vena yugular. Las venas laterales pueden cubrir la cápsula debiendo ser identificadas y ligadas antes de realizar la enucleación de la glándula.

Las venas tiroideas inferiores dejan el polo inferior en una o más ramas, formando frecuentemente un plexo. La vena tiroidea inferior no suele discurrir adyacente a la arteria tiroidea inferior, que se encuentra en la zona media del tercio inferior de la glándula. La arteria tiroidea inferior discurre más cercana a las venas medias o laterales.

La vena tiroidea inferior drena en la vena yugular interna aunque a veces lo hace directamente a la vena innominada. Ocasionalmente una vena drena el

istmo (**la vena tiroidea media**) bajando sobre la tráquea para desembocar en la vena innominada.

Las venas tiroideas inferiores pueden discurrir muy próximas a los nervios recurrentes en su ascenso. En esta área el nervio recurrente laríngeo es especialmente vulnerable

2.2.3. b.- Las Arterias

Las arterias tiroideas superiores son la primera rama de la arteria carótida externa tras la bifurcación de la arteria carótida común. Discurren hacia abajo y medialmente sobre la superficie de los músculos constrictores inferiores entrando en el polo superior de la glándula tiroides en su superficie anteromedial. En su descenso discurren inferior y lateral al nervio laríngeo desde aproximadamente 1 cm por encima del polo superior de la glándula, aunque puede ir entrelazado con sus ramas. Debemos tener mucho cuidado al ligar la arteria tiroidea superior en su entrada en la glándula para evitar lesionar el nervio. Ocasionalmente una rama de la arteria tiroidea superior irriga el lóbulo

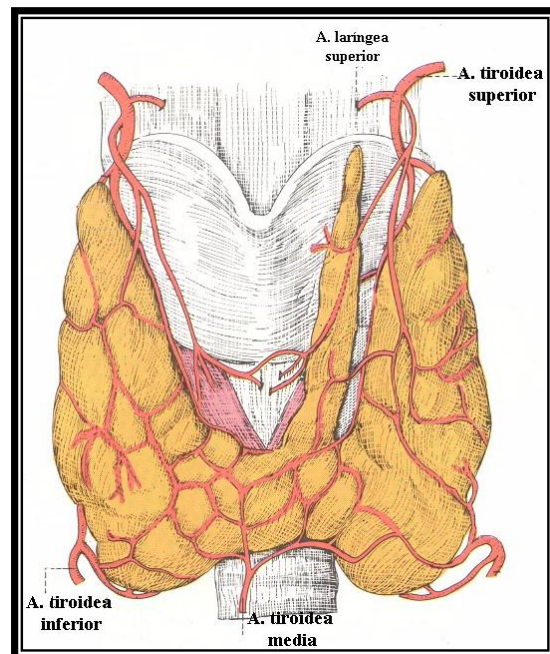


Figura 7. Vascularización arterial del cuello

piramidal y la zona superior del istmo y puede sangrar cuando se liga la arteria tiroidea superior por debajo de esta rama al realizar la tiroidectomía.

Las arterias tiroideas inferiores nacen del tronco tirobicervicoescapular después del origen de las arterias subclavias. Estas arterias ascienden detrás de las venas yugulares y de las arterias carótidas hasta la altura del polo tiroideo inferior. Entonces hacen un giro hacia abajo y medial y entra en la glándula por su porción media y no en el polo inferior como se indica en muchos tratados. Para localizar la arteria tiroidea inferior, el cirujano debe

rechazar con cuidado la glándula medialmente y la vena yugular lateralmente, apareciendo bajo la arteria carótida. Antes de entrar en el tiroides, la arteria tiroidea inferior puede dividirse en una o más ramas que pueden ir íntimamente asociadas con el nervio recurrente o sus ramas.

Una de las ramas de la arteria tiroidea inferior irriga la glándula paratiroides inferior, y una pequeña rama frecuentemente irriga la glándula paratiroides superior, aunque a veces sea una rama de la arteria superior la responsable de la irrigación de las glándulas paratiroides superiores.

Las ramas terminales de las arterias tiroideas superiores e inferiores acaban uniéndose formando arcadas arteriales comunicantes supra e infraístmicas.

La arteria tiroidea inferior puede raramente nacer de la aorta o de la arteria innominada y pasar directamente hacia arriba anterior a la tráquea y entrar en el borde inferior del istmo. Cuando esto ocurre se liga junto con las venas tiroideas inferiores.

Puede también existir una **arteria tiroidea media** (Neubauer) que se origina del cayado de la aorta o del tronco arterial braquiocefálico y dirigiéndose hacia arriba y adelante llega al borde inferior del istmo donde refuerza la arcada infraístmica.

2.2.4. Sistema Linfático

Los conocimientos del drenaje linfático tiroideo se obtiene de la disección anatómica, técnicas de inyección de sustancias y estudios de contraste radiológico (linfografías). Una de las características más importantes del drenaje linfático del tiroides es su extensión pudiendo fluir en múltiples direcciones: verticalmente tan lejos como el mediastino o región cervical alta, y horizontalmente hasta la región lateral cervical o retrofaríngea, incluso llegando al lado opuesto.

Los linfáticos se originan en la intimidad de la glándula formando un plexo subglandular. Desde allí los **colectores** principales son los **medios** (superiores e inferiores) y los **laterales**. En general los linfáticos acompañan a las venas. Los colectores medios superiores drenan desde el borde superior del istmo

hasta los ganglios prelaríngeos. Los colectores medios inferiores desde el borde inferior del istmo hacia los ganglios intratorácicos y pretraqueales. Los colectores laterales emergen en toda la extensión de los lóbulos laterales alcanzando los ganglios de la cadena yugular.

Por tanto, los ganglios linfáticos dependientes del tiroides podemos agruparlos en: **paraglandulares, pretraqueales, paratraqueales, de la cadena del nervio recurrente, mediastínicos anterosuperiores, yugulares superiores, yugulares medios, yugulares inferiores** (que se localizan anteriores y laterales a la vena subclavia), y los **grupos retrofaríngeos y retroesofágicos**.

Los grupos ganglionares yugulares forman los nódulos profundos del cuello. Todos son adyacentes a la vena yugular interna y están situados bajo el músculo esternocleidomastoideo.

2.2.5. Los Nervios

Los nervios recurrentes laríngeos parten de los nervios vagos a diferentes niveles en cada lado. El recurrente derecho parte cuando el vago cruza la arteria subclavia, el nervio gira alrededor de la subclavia por detrás y asciende lateral a la tráquea entrando en la laringe posterior al tiroides a nivel de la articulación cricotiroidea. El recurrente izquierdo deja el vago cuando éste cruza el cayado aórtico. Rodea el cayado y asciende lateral a la tráquea para terminar sus ramas en los músculos laríngeos.

Los nervios recurrentes se sitúan uno o dos centímetros laterales a la tráquea a nivel del polo inferior de la glándula tiroides. A este nivel el recurrente puede ir íntimamente relacionado con ramas de la arteria tiroidea inferior, pudiendo pasar posterior o superficial a

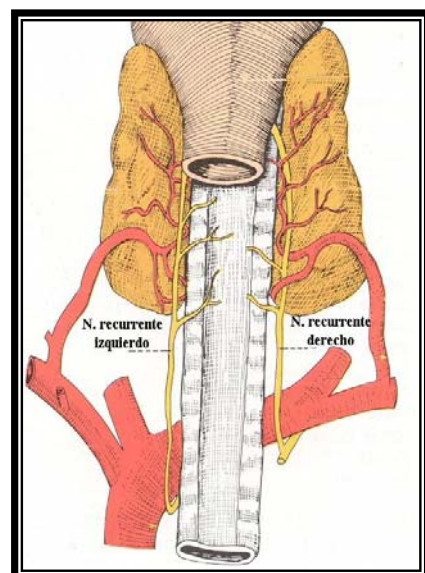
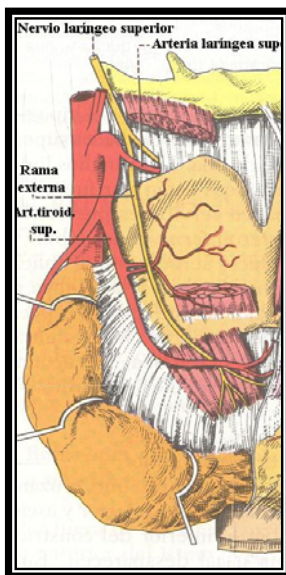


Figura 8. Nervios recurrentes

la misma o sus ramas. Por tanto, esta zona es la más vulnerable para la lesión de los recurrentes. Reed incluso describe 28 tipos de relaciones posicionales entre la arteria tiroidea inferior y el nervio recurrente. Investigaciones hechas

por Dedo indican que el nervio recurrente laríngeo sólo tiene un ramo motor para inervar los músculos laríngeos. El resto de ramas extralaríngeas son sensoriales, una de estas ramas sensoriales puede anastomosarse con ramas del nervio laríngeo superior formando **el asa de Galeno**.

Desde el punto de vista práctico, el cirujano debe considerar cada ramo extralaríngeo del nervio recurrente, como un posible nervio motor y por tanto preservar todas las ramas. En su ascenso el nervio recurrente continúa medialmente relacionado con la cápsula posterior del tercio medio de la glándula tiroides y entra a la laringe entre el arco del cartílago cricoides y el cuerno inferior del cartílago tiroides. Los nervios recurrentes en raras ocasiones no recurren y pasan directamente desde los vagos cruzando en íntima relación con los vasos tiroideos superiores.



Los nervios laríngeos superiores parten del nervio vago a nivel de la base del cráneo (espacio retroestíleo) y descienden medial a los vasos carotídeos y a nivel del cuerno hioideo se divide en dos ramas. La rama interna sensorial penetra por la membrana tiroidea y se anastomosa con la rama sensorial del recurrente completando el asa de Galeno. La rama externa discurre por la superficie lateral del músculo constrictor faríngeo inferior, desciende, e inerva la musculatura cricotiroidea. Ambos ramos discurren adyacentes a la arteria tiroidea

Figura 9. Nervios Laríngeos

superior y pueden lesionarse si ligamos la arteria en bloque y demasiado proximal. Cuando se lesiona un nervio recurrente se provoca la parálisis de la cuerda vocal ipsilateral.

2.2.6. Glándula Tiroides (Rossi, 1997)

La glándula tiroidea normal es blanda y desigual en formas y pesos (alrededor de 20 gr.). Se compone de dos lóbulos laterales y un puente de unión, el istmo, tejido tiroideo de grosor variable, pero mucho más delgado que

los lóbulos laterales. En una persona normal, el istmo puede ser palpado contra la tráquea a nivel entre el cartílago cricoides y el manubrio esternal. Los lóbulos laterales se encuentran bajo la musculatura vertical y los músculos esternocleidomastoideos, siendo difícil palparlos aún en una persona joven. Cada lóbulo mide aproximadamente 4.5 cm de alto, 1-2cm de ancho y 2-3 cm de grosor. Con frecuencia existe un lóbulo piramidal desde el istmo, con más frecuencia en el lado izquierdo, que es el resultado del camino migratorio de la glándula tiroides durante el desarrollo embrionario.

2.2.7. Glándulas Paratiroides (Rossi, 1997).

Es básico conocer el desarrollo embrionario y la anatomía normal de las glándulas paratiroides para una buena actuación quirúrgica sobre las mismas. El cirujano debe estar familiarizado con el aspecto normal y anormal de las mismas. La posición de las glándulas de un lado es simétrica a las del otro en un 80% de los casos. Las paratiroides superiores se encuentran más frecuentemente en la intersección entre el nervio laríngeo y la arteria tiroidea inferior. La localización más frecuente de las paratiroides inferiores es más ventral, pegadas al polo inferior del tiroides o sobre el timo. En algunos pacientes, las paratiroides se sitúan muy arriba por un fallo en el descenso durante el desarrollo embriológico. Wang describió las probabilidades de localización de las paratiroides según el siguiente cuadro.

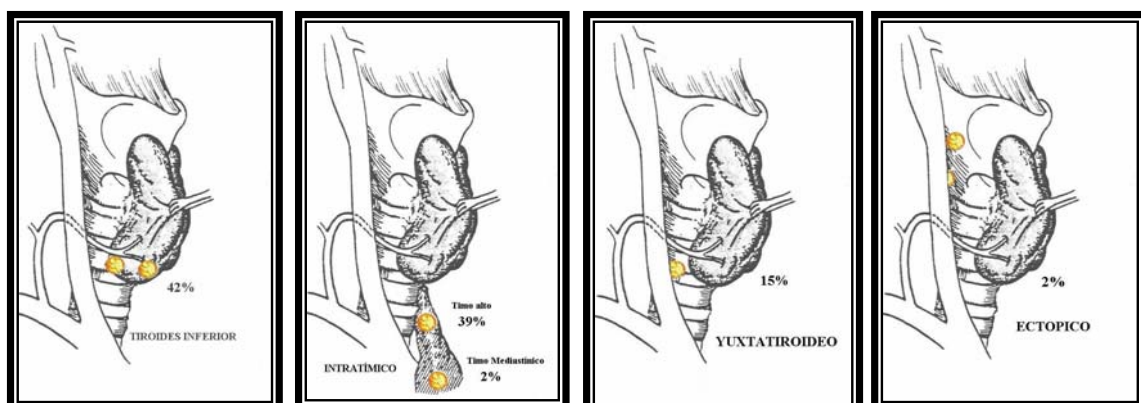


Figura 10. Localización de las glándulas paratiroides superiores

Las paratiroides se encuentran rodeadas frecuentemente de un tejido conectivo que une el borde posterior del tiroides con la laringe. El peso normal de estas glándulas es de 35-49mg. (variando entre 10-80mg) y su tamaño habitual es de 5x3x1mm. Son de color amarillento tostado, diferente al de la grasa de alrededor, más brillante.

Cuando se lesiona una paratiroides sangra y se torna más rojiza. Las paratiroides son más blandas que el tejido tiroideo y que los ganglios y puede tener múltiples formas. Frecuentemente la paratiroides superior está debajo de la cápsula tiroidea, no así las inferiores.



Figura 11. Localización de las glándulas paratiroides inferiores.

3. FUNCIONAMIENTO DEL TIROIDES

La función normal de la glándula tiroides consiste en concentrar yodo (I) y sintetizar, almacenar y segregar hormonas. Para la síntesis hormonal el tiroides necesita, además de yodo, el aminoácido tirosina. El yodo ingresa en el organismo con el agua y los alimentos y es eliminado con las heces y con la orina. Las necesidades de yodo son del orden de 100-200µgr/día. En la secreción de L-tiroxina (T₄) y 3,5,3'-triyodo-L-tironina (T₃), que constituyen las hormonas tiroideas activas, influyen multitud de procesos metabólicos. (S. de Castro del Pozo, 1995).

La síntesis de hormonas tiroideas depende de la captación de yodo, del metabolismo normal del yodo y de la síntesis de la proteína receptora del yodo, la tiroglobulina. La estructura de la tiroglobulina fomenta la formación de T₄ y T₃. Por su parte, la secreción de una cantidad normal de hormona exige una tasa de síntesis hormonal y de hidrólisis de la tiroglobulina normales para liberar las hormonas activas. El yodo penetra en el tiroides en forma de yoduro inorgánico, cuya fuente es el yoduro procedente de la desyodación bien de las hormonas tiroideas, o bien del yoduro consumido con los alimentos, el agua o los fármacos.

Esta síntesis comienza con la de yodotirosinas, la monoyodotirosina (MIT) y diyodotirosina (DIT), cuya estructura es una molécula de tirosina con uno ó dos átomos de yodo. En esta fase interviene una peroxidasa. Posteriormente se acoplan las yodotirosinas para constituir las verdaderas hormonas tiroideas ó yodotironinas, que son la tetrayodotironina (T₄) y la triyodotironina (T₃); que son el resultado del acoplamiento de dos moléculas de DIT, y de una molécula de DIT y una de MIT, respectivamente. Las moléculas sintetizadas de este modo forman parte de una molécula proteica de gran tamaño, la tiroglobulina, y así son almacenadas hasta que son liberadas por enzimas proteolíticas y pasan a sangre.

La producción diaria de T_4 es de 800-100 μ g y la de T_3 de 30-40 μ g. El 80% de la T_3 procede de la desyodación extratiroidea de la T_4 que, por tanto, en cierto modo, se comporta como una prohormona. La T_3 es más activa, tiene una vida media más corta que la T_4 . Ésta también puede convertirse en la T_3 inversa (rT_3), que es inactiva. La rT_3 aumenta porque se reduce su desyodación, que corre a cargo de la misma enzima que convierte la T_4 en T_3 , en el ayuno y en enfermos graves, como mecanismo de adaptación para reducir el gasto de energía.

La T_4 y la T_3 sufren diversas reacciones después de penetrar en el interior de la célula, que conducen en última instancia a su eliminación o inactivación. Las hormonas tiroideas se metabolizan fundamentalmente por la extracción secuencial de átomos de yoduro y la obtención final del núcleo de tirosina, libre de yodo. Mientras que el tiroides constituye la única fuente endógena de la tiroxina libre (fT_4), tan sólo secreta el 20% de T_3 , generándose el resto en tejidos extraglandulares (principalmente hígado, músculo y riñón) a partir de T_4 por un mecanismo de desyodación. Las vías de desyodación son responsables aproximadamente del 70% del metabolismo de T_4 y T_3 . En el caso de la T_4 , la vía metabólica más importante es la 5'-monodesyodación, por la cual se genera T_3 . Aproximadamente el 30% de la T_4 se convierte en T_3 , que posee una potencia metabólicamente superior; por ello, casi todo el efecto metabólico de la T_4 se atribuye a la acción de su producto T_3 . Normalmente, la formación extraglandular de T_3 es responsable del 80% de los niveles sanguíneos y de la producción global; el resto procede de la secreción tiroidea. (Harrison 14 ed., 1988).

Las hormonas tiroideas modifican el crecimiento y maduración de los tejidos, la respiración celular, el gasto energético total y el recambio de casi todos los sustratos, vitaminas y hormonas, incluidas las propias hormonas tiroideas.

La función tiroidea está regulada por dos mecanismos generales, el primero supratiroideo y el segundo intratiroideo.

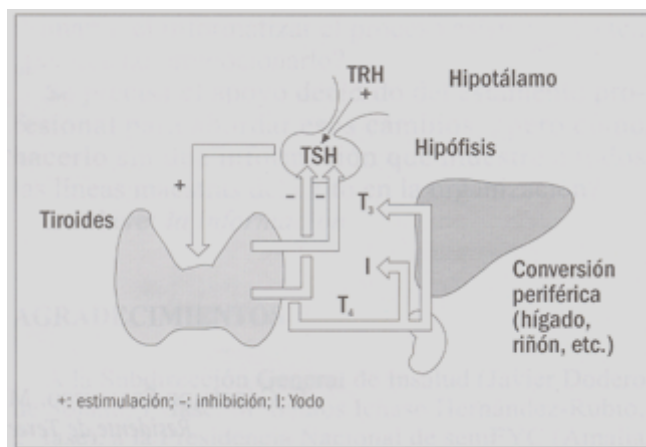


Figura 12. Regulación del sistema hipotálamo-hipofisario-tiroideo.

El mediador de la regulación supratiroidea es la tirotrópica (hormona estimuladora del tiroides, TSH), una glucoproteína secretada por las células basófilas (tirotrópicas) de la hipófisis anterior. La TSH estimula la hipertrofia e hiperplasia del tiroides; acelera la mayor parte del metabolismo intermediario tiroideo; aumenta la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, incluida la tiroglobulina, y estimula la síntesis y secreción de hormonas tiroideas.

La secreción de TSH depende, a su vez, de dos mecanismos opuestos en la célula tirotrópica. La hormona liberadora de tirotrópica (TRH), un tripéptido de origen hipotalámico, estimula la secreción y síntesis de TSH, mientras que las hormonas tiroideas, inhiben el mecanismo secretor de la TSH de forma directa y antagonizan la acción de la TRH.

Por tanto, el control homeostático de la secreción de TSH se ejerce a través de un mecanismo de retroalimentación negativa por las hormonas tiroideas; el umbral de inhibición se controla por la TRH.

La regulación intratiroidea de la función del tiroides es también importante. Los cambios del yodo orgánico glandular producen cambios de la actividad del transporte de yoduro del tiroides y controlan el crecimiento, la captación de aminoácidos, el metabolismo de la glucosa y la síntesis de ácidos

nucleicos. Estas acciones se manifiestan en ausencia de estimulación de TSH; sería una autorregulación.

Las enfermedades tiroideas se manifiestan por alteraciones cualitativas o cuantitativas de la secreción hormonal, aumento del tamaño del tiroides (bocio) o ambos fenómenos.

La secreción hormonal insuficiente origina *hipotiroidismo* o *mixedema*, que se caracteriza esencialmente por la disminución del gasto calórico (hipo metabolismo). Por el contrario, la secreción excesiva de hormona produce un estado hipermetabólico y otros síntomas que se conocen con el nombre de *hipertiroidismo* o *tirotoxicosis*. El aumento del tamaño de la glándula tiroidea (normalmente pesa de 15 a 18g en el adulto) puede ser generalizado o local. No obstante, el aumento generalizado no siempre es simétrico, ya que el lóbulo derecho tiende a aumentar más que el izquierdo. El bocio se asocia con aumento, normalidad o disminución de la secreción hormonal, dependiendo de la enfermedad de base. Habitualmente, el aumento localizado de tamaño refleja una enfermedad neoplásica, benigna o maligna; en el primer caso se produce a veces hipersecreción hormonal e hipertiroidismo; los tumores malignos rara vez lo hacen.

4. CONCEPTOS DE GENÉTICA Y EPIGENÉTICA

4.1.- INTRODUCCIÓN

La nueva medicina se basa en conocer los genes y proteínas que controlan el comportamiento de las células, en qué partes del cuerpo se usa cada uno de ellos, qué hacen y en qué magnitud, y los cambios que padecen cuando se pasa de la salud a la enfermedad.

Esto es en realidad anatomía, fisiología y patología, es decir, el estudio clásico en medicina pero en el que hemos bajado un nivel, de las células mismas pasamos a los componentes que las controlan. La idea es obtener estos componentes, producirlos en grandes cantidades y utilizarlos como medicinas, o utilizar su actividad para diseñar una estrategia curativa. En definitiva, utilizar la habilidad intrínseca de nuestro cuerpo en construirse a él mismo, en mantenerse vivo y en auto repararse.

En la mayor parte de los pacientes con una patología tiroidea, convergen una serie de factores genéticos y ambientales que interactúan de forma conjunta para que se produzca patología. Sin embargo, muchos de estos factores causales son desconocidos y aún es necesario un gran esfuerzo en el campo de la epidemiología clínica y molecular para identificarlos. Desde el punto de vista genético, el cáncer de tiroides es una enfermedad compleja cuya etiología puede considerarse poligénica, por lo que pueden existir varios genes de baja penetrancia que incrementen el riesgo de desarrollo de esta patología.

Cada vez hay más antecedentes que confirman la existencia de mecanismos epigenéticos que permiten el traspaso de caracteres de una generación a otra. Tanto los hábitos de comportamiento, como los riesgos de enfermar, se pueden transmitir por vías independientes a la genética convencional. A esto se ha denominado “mecanismos epigenéticos”. Estos mecanismos serían el interlocutor entre los factores ambientales y diferentes cambios producidos a nivel de expresión en el genoma. Diversos trabajos han

confirmado la posibilidad de silenciar o activar genes sin modificar su estructura.

El interruptor genético que poseía una generación está también claramente presente en la segunda generación. Eso confirma que los genes no están enclaustrados en el núcleo bajo llave estricta y blindada. Cualquier cambio medio ambiental (cambios del “ambioma”) afectan a la forma de actuar de los genes, y eso se puede heredar a través de las generaciones. Lo que experimentamos no solo nos afecta a nosotros, sino a nuestros hijos y nietos.

4.2.- ALGUNOS CONCEPTOS BÁSICOS DE GENÉTICA Y EPIGENÉTICA.

La **Genética** es la rama de la Biología que trata de la herencia y de su variación. La herencia se refiere a que la descendencia tiende a asemejarse a sus padres, basándonos en el hecho de que nuestro aspecto y función biológica, es decir, nuestro **fenotipo**, viene determinado en gran medida por nuestra constitución genética, es decir, nuestro **genotipo**.

En términos sencillos, el **gen** es la **unidad funcional** de la herencia. En términos químicos es una cadena lineal de nucleótidos (los bloques químicos que constituyen el ADN y el ARN). Una definición más conceptual es considerarlo como una unidad de almacenamiento de información capaz de sufrir replicación, mutación y expresión.

Cada individuo es único porque hereda de sus padres un patrimonio genético o **genoma** que le es propio. Esta información o material genético está grabada en el centro del núcleo de cada célula en forma de empaquetado de unidades discretas, denominadas **cromosomas**. Cada núcleo contiene 23 parejas de cromosomas homólogos. Cada uno de estos cromosomas está formado por una hélice doble de ADN (ácido desoxirribonucleico), soporte de la herencia. El ADN está formado por una cadena de **bases químicas**, compuestas por átomos de carbono, nitrógeno, hidrógeno y oxígeno. Existen

cuatro tipos diferentes de bases químicas en las moléculas de ADN: Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C), Timina (T). Cada filamento de ADN tiene genes, los cuales están compuestos por un conjunto de **tripletes**, que son secuencias de tres bases nitrogenadas. Cada triplete está formado por tres de las letras A, G, C y T, y se corresponde a uno de los veinte aminoácidos que componen las **proteínas**.

Para que una célula produzca una proteína tiene que descodificar el ADN y fabricar un transmisor de mensajes resultado de la transcripción de un gen determinado. Esta es la función del ARNm (ácido ribonucleico mensajero). El ARNm actúa como un molde en el que los aminoácidos adoptan su forma definitiva: la proteína.

En las células eucariotas, cada cromosoma consiste en una molécula de ADN bicatenario asociada con proteínas básicas denominadas **histonas**, y con otras proteínas no histónicas. La función de las histonas es la de constituir el soporte estructural del ADN en una fibra de estructura compleja, la **cromatina**, cuya subunidad básica es el **nucleosoma**.

Transmisión de los genes: en células somáticas antes de cada división, la célula madre fabrica una reproducción del ADN y de sus 46 cromosomas. Cada célula hija recibe una copia.

En lo que se refiere a células reproductoras, el proceso es diferente. Cada célula hija recibe sólo la mitad de los cromosomas de la célula madre. En el caso de los ovocitos, su dotación cromosómica estaría constituida por 23 cromosomas, de los cuales el correspondiente al par sexual sería un cromosoma X; mientras que en los espermatozoides, la dotación cromosómica estaría constituida por 23 cromosomas, de los cuales el correspondiente al par sexual sería un cromosoma X ó Y con una probabilidad del 50% en cada caso.

Genotipo Y Fenotipo: *El genotipo es un marco de referencia dentro del cual se pueden expresar muchísimos fenotipos posibles, y el desarrollo de estos fenotipos es epigénico.*

Genotipado: consiste en definir la constitución molecular de uno o más genes en relación a un rasgo específico o a un conjunto de ellos, por ejemplo, mediante la búsqueda de patrones característicos de pérdida o ganancia de una región cromosómica.

Aunque hay muchas excepciones, los miembros de muchas especies tienen un número específico de cromosomas, denominado **número diploide** (**2n**), presentes en cada célula somática. Mediante un cuidadoso análisis, se ve que estos cromosomas están en parejas y cada miembro del par, cuando son visibles en la división celular, comparte casi la misma apariencia. Los miembros de cada par, denominados **cromosomas homólogos**, son idénticos en cuanto a su longitud y a la localización del centrómero, el punto en el que se unen las fibras del huso en la división. También tienen la misma secuencia de lugares génicos o **loci** y se aparean en la meiosis.

El número de tipos diferentes de cromosomas de cualquier especie diploide es igual a la mitad del número diploide, que se denomina el **número haploide** (**n**).

Oncogén: Es un gen que, como resultado de la mutación de un gen normal (llamado protooncogén) que interviene en el crecimiento y/o proliferación celular, da lugar a una transformación de células normales en cancerosas.

4.3.- CAUSAS DE LA VARIACIÓN GENÉTICA

Hay dos causas de variación genética: a nivel celular las alteraciones cromosómicas **estructurales** y alteraciones cromosómicas **numéricas**.

Entre las primeras, también llamadas **anomalías cromosómicas**, se encuentran la inversión, la duplicación, la delección y el reordenamiento de segmentos cromosómicos (inversiones, inserciones, traslocaciones que pueden ser balanceadas, no balanceadas y robertsonianas). Las formas alternativas de un gen se denominan **alelos**. Frecuentemente, aunque no siempre, la variación genética da lugar al cambio de alguna característica del organismo. Una vez

que forma parte del repertorio genético del organismo, tal variante puede extenderse por toda la población.

Las alteraciones en el número de cromosomas que afectan solo a uno o varios cromosomas reciben el nombre de **aneuploidías** (nulisomía, monosomía, trisomía, tetrasomía...). Estos fenómenos se deben a la ocurrencia de un fenómeno de no disyunción meiótica o mitótica que dará como resultado un retraso de la entrada. En las monosomías y trisomías pueden afectar tanto a los autosomas como a los cromosomas sexuales, y originan síndromes muy diversos en el hombre, así como anormalidades en la segregación cromosómica.

Las variaciones consistentes en presentar un número de cromosomas múltiplo del complemento haploide normal de una especie se denominan **euploidías**. Dependiendo del número de dotaciones cromosómicas de los organismos que las presentan, éstos se clasifican en monoploides, diploides, triploides, tetraploides, etc. Dependiendo del origen de las múltiples series cromosómicas que presentan, los individuos poliploides reciben el nombre de **autopoliploides** (cromosomas homólogos de una misma especie) o **alopoliploides** (cromosomas homólogos de dos o más especies que han hibridado entre sí). Las plantas autotriploides y autotetraploides presentan propiedades que les confieren mayor valor comercial (por ejemplo, mayor tamaño).

Los cromosomas son depósitos de información en base a:

1-Los genes codificadores de proteínas son los que conocemos como los depósitos de la herencia.

2-Los genes no codificadores cumplen una función destacada. Estos genes resultan importantes para la herencia y el desarrollo de las enfermedades y dan lugar a ARN activos, pudiendo alterar el comportamiento de los genes codificadores.

3-La capa epigenética de la información: resulta crucial para el desarrollo, el crecimiento, el envejecimiento y el cáncer. No altera la secuencia de ADN, pero ciertamente puede afectar la salud.

A modo de resumen, se puede decir que la Capa Epigenética:

- a) son moléculas que modifican la composición química del ADN
- b) no alteran la secuencia de ADN
- c) pueden afectar a la salud y características de los organismos
- d) algunos pasan de padres a hijos
- e) parecen tener un papel esencial en el desarrollo, el envejecimiento y el cáncer
- f) las epimutaciones contribuyen a la diabetes, esquizofrenia, trastorno bipolar y otras enfermedades complejas

Sin duda son las “epimutaciones” las que dan origen a enfermedades como la esquizofrenia, y las variaciones epigenéticas explican las discordancias entre gemelos idénticos que comparten las secuencias de ADN idénticas.

4.4.- ¿CÓMO SE ALMACENA LA INFORMACIÓN GENÉTICA EN EL ADN?

La secuenciación de nucleótidos de un fragmento de ADN que constituye un gen está presente en forma de un **código genético**. Este código especifica la naturaleza química de las proteínas (la composición de los aminoácidos) que son el producto final de la expresión génica. Se producen mutaciones cuando se altera la secuencia de nucleótidos. En el ADN hay cuatro nucleótidos distintos, diferenciándose entre sí por uno de sus componentes, la base

nitrogenada. El código genético está constituido en base a tripletes, por consiguiente, cada combinación de tres nucleótidos constituye una palabra del código. Casi todos los posibles tripletes especifican uno de los 20 aminoácidos (unidades químicas que forman las proteínas).

Expresión del código genético: La información codificada en el ADN se transfiere primero en el proceso de **transcripción** a la molécula de **ARN mensajero (ARNm)**. Posteriormente, tras un breve procesamiento, el ARNm se asocia con un orgánulo celular, el ribosoma, en donde se **traduce** en una molécula proteica.

La definición de **epigenética** (del griego *epi*, en o sobre) se refiere a los cambios reversibles del ADN y las proteínas que se unen a él, y que hace que unos genes se expresen o no en función de condiciones exteriores.

Cuando hablamos de epigenética nos referimos a fenómenos que no afectan la secuencia de ADN de los genes pero que sí varían su expresión. Es la herencia de patrones de expresión de genes que no vienen determinados por la secuencia genética (la cadena de pares de bases del ADN de cada individuo). Y esta herencia viene fijada porque los genes se expresan o no dependiendo de ciertas modificaciones bioquímicas como es la metilación o adenilación del ADN o de las histonas, o bien la forma de la cromatina, y otras causas que aún no conocemos.

El desarrollo epigenético, entonces, implica un enriquecimiento de la información genética, y tal enriquecimiento ocurre con la influencia del ambiente (ambioma), y esto es válido tanto para la salud como en las situaciones patológicas. Y si lo genético influye sobre la conducta y la conducta sobre lo genético, la causalidad es un fenómeno circular y transgeneracional.

La epigenética es un factor de control para la actividad del ADN de los genes silenciados o no, y tiene un papel principal en el desarrollo de enfermedades. ***Epigenoma Y Ambioma***: La epigenética es el interlocutor del ambiente con la genética. Es lo que explica la acción del estilo de vida sobre

los genes. **Las enfermedades se deben a alteraciones genéticas y/o epigenéticas.**

4.5.- EPIGÉNESIS

Las variaciones epigenéticas controlan la actividad de los genes. Si es alta la concentración de “X” sustancia, la actividad será alta. El código epigenético está constituido por un sistema de moléculas unidas al ADN o a las histonas, y gobierna la expresión de los genes pues sus colas proteicas (las de las histonas) catalizan una gran variedad de adiciones químicas, como los acetilos que amplifican genes vecinos.

La herencia epigenética resulta de la transmisión de secuencias de información no-ADN a través de la meiosis o mitosis.

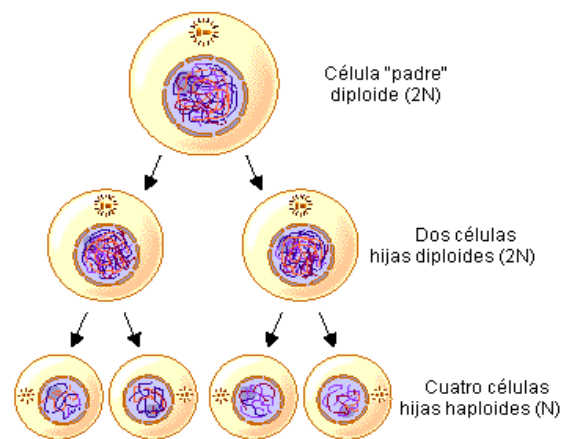


Figura 13. Esquema sobre la división celular (www.epigenetica.org)

La información epigenética modula la expresión de los genes sin alterar la secuencia de ADN. Y lo hace a través de diferentes mecanismos a saber:

1-Los patrones de metilación de ADN son los mejores estudiados y entendidos como marcadores de fenómenos epigenéticos. La metilación de la citosina del ADN: es una modificación del ADN, en la que un grupo metilo es transferido desde S-adenosilmetionina a una posición C-5 de citosina por una ADN-5 metiltransferasa. La metilación del ADN ocurre, casi exclusivamente, en

dinucleótidos CpG, teniendo un importante papel en la regulación de la expresión del gen.

2-Modificación de histonas: incluyendo acetilación, metilación y fosforilación. La epigenética hace referencia, entonces, a cualquier mecanismo que utilice un organismo para traspasar información hereditaria de una generación a otra.

3-La Impronta Genómica (Genomic Imprinting).

El imprinting, en el marco epigenético, se refiere a la forma de manifestarse que tienen los genes “imprintados”, ligados a su origen parental. El Imprinting o Impronta Genética significa, en pocas palabras, que los genes conservan la memoria de donde proceden.

Un gen imprintado se manifiesta de una manera cuando su origen es paterno y de otra cuando proviene del gameto materno. Por eso, una misma falla genética y en un mismo cromosoma puede manifestarse a través de síndromes diferentes, según ese fragmento provenga de uno u otro progenitor. Parece ser que existe un mecanismo celular que de algún modo “marca” o deja una impronta sobre todos los genes “imprintables” de acuerdo al sexo del individuo.

Esto quiere decir que todos los genes imprintables, y de cada gen sus alelos, tendrán un imprinting paterno si provienen de un hombre. De igual modo sucederá con aquellos genes provenientes de una mujer, el imprinting será materno.

Por ello, hoy pensamos que algo más, aparte del ADN, es transmitido a través de generaciones. Una capa informativa oculta (epigenética) que actúa y es capaz de controlar directamente el funcionamiento de nuestros genes. Lo que significa que la herencia no se atiene solamente a los genes que se heredan, sino que debemos tener en cuenta si esos genes se transmiten silenciados, apagados o activados. Trabajo hecho por otros genes no codificadores, pero de una tremenda importancia. La actividad de los genes es entonces controlada por un interruptor, y la unión de una simple sustancia

química a estas partes interesadas en la herencia dicta si el gen se apaga o se enciende. Se expresa o no.

Este hecho de que los genes puedan ser activados o apagados a través de interruptores lo llamamos Epigenética. Y es la epigenética, en definitiva, el fenómeno que nos muestra como los genes se activan o desactivan, revolucionando profundamente a la nueva biología.

La modificación epigenética se basa en cambios del “código de histonas”, de la cromatina. Y dicho código define un estado que determina que un gen esté “activado” o “silenciado”. Entonces, sumado al llamado **“código genético”**, existiría otro código que, independientemente de la secuencia del gen, determinaría la apertura o cierre de la cromatina para exponer o no una determinada región del ADN. Y a diferencia del código genético, dependería del tipo y número de modificaciones químicas realizadas sobre el ADN y/o las histonas. Un **código epigenético**.

El desarrollo epigenético, implica un enriquecimiento de la información genética, y tal enriquecimiento ocurre influido por el ambiente (ambiotoma), y esto es válido tanto para la salud como en las situaciones patológicas. Y si lo genético influye sobre la conducta y la conducta sobre lo genético, la causalidad es un fenómeno circular, como lo he señalado y graficado anteriormente.

En el SNC los cambios epigenéticos son dinámicos. Procesos como la formación de la memoria a largo plazo requieren de la participación de señales epigenéticas en la cromatina, que es una región “estable” desde el punto de vista químico, en la cual se pueden codificar cambios persistentes.

En definitiva respecto a la diferenciación celular y plasticidad, la existencia del mecanismo denominado “silenciamiento génico” es fundamental. Este mecanismo está terciado por proteínas que “alistan” otras proteínas competentes para forjar transformaciones epigenéticas, lo que representa que, a pesar de ostentar la idéntica “base de datos”, algunos genes van a estar activos y otros inactivos (o “silenciados”) en un determinado tipo celular,

mientras que otros genes estarán activos o inactivos en otros tipos celulares. Así, células genotípicamente idénticas pueden ser fenotípicamente diferentes.

La **acetilación** de las histonas tiene como resultado la apertura de la cromatina, proporcionando la transcripción del ADN. En cambio la **metilación** forja el silenciamiento de una fijada región del genoma. Por ejemplo, un determinado aminoácido puede ser acetilado en la región de la cromatina que debe estar activa, pero puede ser metilado en regiones del genoma que deben ser silenciadas.

Los metilos epigenéticos tienen especial afinidad por las citosinas. Cuanto más metilada está una hebra de ADN, menor es la probabilidad de transcribirse en ARN. La metilación del ADN defiende el genoma, por ejemplo, de los transposones ya que los bloquea.

Los **transposones** son genes muy particulares. También llamados genes saltarines. Que tienen la propiedad de auto clonarse; Insertarse en regiones distantes del genoma; Y constituyen el 45% de la secuencia del genoma. Su función es algunas veces la de superactivar genes y otras veces la de desactivarlos.

Las señales ambientales y cambios en el entorno son capaces de modificar el patrón de metilación del ADN, afectando de esta forma la producción de las correspondientes proteínas. Es decir, el ambioma nos cambia. Se ponen en expedición caminos que activan procesos bioquímicos celulares, los cuales acarrearán reformas en la cromatina, la abren y aumentan de este modo la accesibilidad del ADN a los agentes desmetilantes y acetilantes, para volver a permitir la expresión de estos genes o la cierran, impidiendo la transcripción.

El destino de una célula está establecido no únicamente por la sucesión definida de nucleótidos en los genes codificados en el ADN, sino además por la manera en que el material genético y sus proteínas coligadas (**ADN+histonas = cromatina**) están reformados químicamente.

Por otro lado, son una ventaja los cambios epigenéticos que se producen en la cromatina. Hay una gran capacidad para acumular información, ya que este tipo de cambios no dependen de un cambio en la secuencia de nucleótidos del ADN, sino del grado en que la cromatina “expone” al ADN para que se transcriban diferencialmente determinados genes y que otros permanezcan “silenciados”.

La modificación de los componentes epigenéticos (cromatínicos), que pueden ser perturbados por cambios en este ambiente, causan cambios que consiguen ser heredados por la descendencia en la expresión de distintos genes (como el del receptor de glucocorticoides). Y la interacción de lo genético disposicional y su inhibición o activación ambiental tendrá que ver con la expresión clínica de estas enfermedades. Esto es la base de la regulación epigenética. Capaz de controlar procesos tan complejos como es el caso de la conducta maternante.

El genoma humano se pensaba que contenía alrededor de 100.000 genes. Pero cuando empezaron a secuenciarlo se dieron cuenta de que quizá podría haber hasta 60.000, y poco a poco fue bajando la cifra a un número mucho menor. Ahora sabemos que probablemente haya menos de 30.000 genes. Pero sabemos que el genotipo sólo es un marco de referencia dentro del cual se pueden expresar muchísimos fenotipos posibles, y el desarrollo de estos fenotipos es lo que llamamos epigenética.

Un mapa preciso del genoma humano nos revela muy poco de cómo éste actúa realmente. Porque la herencia no tiene que ver solo con el ADN, sino también con estos interruptores epigenéticos tan importantes, que los activan o desactivan.

Y ahora el gran reto para la biología moderna es poder descifrar el código epigenético, tratando de entender todas las combinaciones de interruptores que existen.

5. NÓDULO TIROIDEO

5.1.- INTRODUCCIÓN

El nódulo tiroideo constituye un trastorno muy frecuente en la población general. Se puede definir como la presencia en el tiroides de una neoformación nodular con diámetro suficiente para ser palpable.

La detección por el médico o el paciente de un nódulo tiroideo siempre crea la incertidumbre sobre un proceso maligno y, aunque sólo entre el 5 y el 15% de los nódulos tiroideos (únicos o múltiples) son malignos, se debe adoptar una estrategia diagnóstica encaminada a identificar los nódulos benignos más comunes evitando intervenciones quirúrgicas innecesarias.

5.2.- PREVALENCIA

La prevalencia de los nódulos tiroideos depende de la población en estudio y de la sensibilidad de los métodos de estudio.

Se calcula que aproximadamente el 4% de la población es portadora de nódulos asintomáticos aunque en estudios ecográficos seriados esta cifra se eleva hasta casi un 30% y en necropsias hasta un 50%. Predominan en el sexo femenino.

La edad media de aparición se sitúa entre los 30 y los 50 años y la prevalencia aumenta con la edad. En un estudio reciente más del 50% de hombres y mujeres en la sexta década de la vida y más del 65% de los hombres y el 90% de las mujeres en la novena década tenían nódulos tiroideos en la autopsia (Burch, 1995). En niños la prevalencia es del 0.2 al 1.5% siendo malignos aproximadamente el 20% (Conolly, 1997).

Aproximadamente la mitad de los nódulos tiroideos son únicos y la otra mitad múltiples. En estudios realizados en pacientes tiroidectomizados se ha demostrado que la palpación no había descubierto entre un 58% y un 70% de nódulos accesorios antes de una tiroidectomía parcial o una total respectivamente; e incluso la ecografía no detectó entre el 41 y el 50% de los nódulos hallados finalmente durante el acto quirúrgico.

Hay estudios que demuestran una mayor prevalencia de nódulos tiroideos y cáncer de tiroides en pacientes con hiperparatiroidismo. Ambos, nódulos tiroideos e hiperparatiroidismo coinciden en un alto porcentaje en pacientes a los que se ha aplicado radioterapia de cabeza y cuello y ambos ocurren con más frecuencia en mujeres de edad media (Ashok, 2000).

Más del 90% de los nódulos tiroideos son benignos. La prevalencia de cáncer entre el conjunto de nódulos tiroideos varía según las series y criterios empleados para la indicación quirúrgica y oscila entre un 5 y un 15%, con promedio de 10%.

Los cánceres ocultos (generalmente papilares), de menos de 1.5 cm, constituyen un hallazgo casual en el 4 al 17% de los bocios extirpados por otras causas y en el 3 al 35% de las necropsias. La relevancia clínica de estos cánceres ocultos no se conoce, pudiendo metastatizar a distancia o permanecer silentes (Conolly, 1997).

5.3.- ETIOLOGÍA

Un gran número de enfermedades tiroideas y algunas lesiones extratiroideas pueden presentarse como nódulos tiroideos. En la tabla 1 se muestran las causas más habituales de enfermedad nodular tiroidea.

Alrededor del 60% de las causas son no neoplásicas; las más habituales son los quistes, los nódulos coloides. Entre las neoplásicas destacan los adenomas y los carcinomas.

Frecuentes	Infrecuentes	Extratiroides
Neoplasias benignas (adenomas)	Tiroiditis subagudas, Hashimoto	Adenomas o quistes paratiroides
Bocio multinodular	Linfoma tiroideo	Quistes tiroglosos
Quistes	Metástasis	Aneurismas carotídeos
Neoplasias malignas (Ca papilar y folicular)	Neoplasias malignas (Carcinoma medular y anaplásico)	Broncocéles, laringocéles
	Graves-Basedow	Higroma quístico
	Otros: hematomas, agenesias de un lóbulo, hiperplasias postcirugía y/o I-131	

Tabla 1. Etiología de la enfermedad nodular tiroidea.

5.4.- EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA

5.4.1. Valoración clínica.

- Antecedentes familiares. El hallazgo de familiares de primer grado con cáncer de tiroides, poliposis familiar (síndrome de Gardner) o neoplasias endocrinas múltiples (MEN 2a y 2b) orientan hacia el carcinoma medular y más raramente al papilar. Una historia familiar de bocio o procedencia de una zona endémica es un factor a favor de la benignidad del nódulo.
- Antecedentes personales. La irradiación cervical (o torácica) durante la infancia o adolescencia implica que el 5% de los pacientes desarrollen un cáncer a partir de los 3-5 años desde la irradiación; con un pico máximo de incidencia a los 15 o 20 años. En estos pacientes los nódulos tiroideos son 10 veces más frecuentes y en el 35% de los casos serán malignos. La existencia de un nódulo tiroideo en un paciente con enfermedad de Graves conlleva también un mayor riesgo de malignidad.

- Sexo y edad: los nódulos tiroideos y la incidencia de cáncer son más frecuentes en mujeres pero la probabilidad de malignidad es superior en los varones. En edades extremas aumentan las posibilidades de que un nódulo tiroideo sea un cáncer.
- Síntomas compresivos: raros si el tamaño de la lesión es menor de 5 cm. La compresión de la tráquea da lugar a disnea, estridor y tos espasmódica nocturna; la compresión del nervio recurrente produce ronquera, estridor y ocasionalmente voz bitonal; si se comprime el esófago aparece disfagia mientras que la compresión de los plexos venosos produce ingurgitación yugular.
- Patrón de crecimiento: el crecimiento en semanas o meses es sugestivo de malignidad, el crecimiento súbito en horas y con dolor, orienta hacia una hemorragia intranodular benigna.
- El número de nódulos palpables: la multinodularidad disminuye las posibilidades de malignidad aunque el carcinoma papilar se asocia con mayor frecuencia al bocio multinodular.
- Consistencia del nódulo: pétreo o duro es sugestivo de malignidad.
- Fijación a planos superficiales o profundos: en cánceres avanzados y algunas tiroiditis.
- Adenopatías cervicales: altamente sugestivas de malignidad si se asocian a un nódulo tiroideo aunque también aparecen en la tiroiditis.

5.4.2. Laboratorio

La determinación de las concentraciones séricas de T4 libre y TSH es suficiente en el estudio funcional del paciente con enfermedad nodular tiroidea. En la mayoría de los casos, los nódulos solitarios se acompañan de normofunción tiroidea. El 5% de los pacientes presenta hipertiroidismo

subclínico (TSH inhibida con hormonas tiroideas normales). En la tiroiditis autoinmune se pueden hallar anticuerpos antitiroideos y en la tiroiditis de Hashimoto es posible determinar anticuerpos antitiroglobulina y antimicrosomales. La existencia de un nódulo que crece en el seno de una tiroiditis de Hashimoto sugiere la presencia de una hiperplasia nodular aunque se debe descartar la presencia de un linfoma (Díez, 1994)).

La calcitonina es útil como marcador tumoral de carcinoma medular aunque no parece que tenga un coste/beneficio favorable el incluirla en protocolos diagnósticos de rutina del nódulo tiroideo (Ridway, 1992).

La tiroglobulina es útil una vez diagnosticado el cáncer pero no diferencia un nódulo benigno de uno maligno.

Factores de la anamnesis	Edad <20 o >60 años
	Antecedentes de irradiación cervical
	Sexo masculino
Factores clínicos	Antecedentes familiares de Ca medular, MEN
	Nódulo único
	Crecimiento rápido
	Consistencia pétrea
	Fijación a planos adyacentes
	Adenopatías regionales
	Signos y síntomas de compresión
Factores de laboratorio	Invasión de otras estructuras cervicales
	Normofunción tiroidea
	Ausencia de captación en la gammagrafía
	Ausencia de respuesta al tratamiento con L-T4

Tabla 2. Factores asociados a malignidad

5.4.3. Punción aspiración con aguja fina (PAAF)

Constituye la prueba de elección para valorar la naturaleza de un nódulo tiroideo. Ha reducido el coste de su diagnóstico y tratamiento y aumentado la proporción de diagnósticos de cánceres en los nódulos que se intervienen

quirúrgicamente. La PAAF permite seleccionar a los pacientes para cirugía y reducir el número de pacientes operados innecesariamente.

Se realiza sin ecografía en nódulos palpables y con aguja fina (23G) para evitar hemorragias y la obtención de muestras excesivamente hemáticas. Es importante la experiencia del citólogo, para disminuir los falsos positivos y negativos y aumentar la rentabilidad del procedimiento (Mazzaferri, 2007).

Los resultados de la aspiración se clasifican dentro de cuatro categorías básicas que incluyen benigno (no existe evidencia de malignidad), sospechoso (incluye neoplasia folicular, neoplasia de células de Hürthle y aspirados con datos sugestivos pero no concluyentes de carcinoma papilar), maligno (aspirados con datos definitivos de carcinoma papilar, anaplásico o metastásico) e insuficiente.

Los resultados insuficientes varían entre el 15 y el 25% de las aspiraciones y están influidos por factores como la experiencia del citólogo, la vascularización nodular, la localización nodular o la prevalencia de lesiones quísticas en la población a estudio. Una técnica depurada y la localización por ecografía son ayudas inestimables para reducir la tasa de resultados insuficientes (Oertel, 1996).

La mayoría de las citologías se consideran benignas (70%) y mediante ellas se pueden diagnosticar tanto adenomas como tiroiditis (aguda, subaguda y crónica linfocitaria).

Los tumores malignos que se pueden diagnosticar por PAAF (5%) son el carcinoma papilar, la variante folicular de carcinoma papilar, el carcinoma medular, el cáncer anaplásico, el linfoma tiroideo y el carcinoma metastásico. No es posible diagnosticar ni el carcinoma folicular ni el carcinoma de células de Hürthle (Sitges Serra, 1999).

Un 10% de las PAAF muestran una citología sospechosa. Una de las situaciones más frecuentes es la obtención de abundantes células foliculares

con poco coloide en proporción, como ocurre en las proliferaciones foliculares y las neoplasias de células de Hürthle. En estos casos es recomendable la cirugía para diferenciar los casos benignos de malignos. No se puede diferenciar por PAAF un adenoma de un carcinoma folicular.

Las causas de error o diagnósticos dudosos en la PAAF incluyen la coexistencia de otros procesos junto a la neoplasia tales como tiroiditis, necrosis, degeneración quística intratumoral, nódulos de muy pequeño tamaño (< 1cm) o muestras insuficientes para el diagnóstico por la escasa celularidad. En la *tabla 3* se resumen las ventajas y los inconvenientes de la PAAF.

VENTAJAS	INCONVENIENTES
Diagnóstico histológico de lesiones benignas y malignas más frecuentes	Interpretación histopatológica precisa (adenoma folicular vs. carcinoma)
Rápida, económica y con un coste/beneficio muy favorable	No homogeneidad en la lesión que provoca error de muestreo
Selección de pacientes para la cirugía	Observador experto

Tabla 3. Ventajas e inconvenientes de la PAAF

Los avances futuros en la aspiración con aguja fina deben incorporar el análisis molecular para la identificación de mutaciones o expresión aberrante de genes en neoplasias específicas. La implantación de protocolos de screening debe aguardar a la identificación de marcadores tumorales específicos (Burch, 1995).

5.4.4. Ecografía en el nódulo tiroideo

La ecografía tiroidea es una exploración simple, reproducible y muy segura. Con los modernos ecógrafos de alta resolución es posible detectar nódulos sólidos de 3 mm y quistes de 2 mm de diámetro, lo que hace que esta técnica sea superior a la exploración física, gammagrafía, tomografía axial computerizada y resonancia magnética en la determinación del número y tamaño de los nódulos y volumen tiroideo.

La ecografía puede precisar si un nódulo es sólido, quístico o mixto pero no si es benigno o maligno. La posibilidad de que un nódulo sólido sea maligno supera el 20%, en lesiones quísticas mixtas se acerca al 12% mientras que en nódulos quísticos puros se sitúa entre 0,6 y 3% (Díez, 1994).

La ecografía es útil también para el diagnóstico de multinodularidad ya que el porcentaje de malignidad disminuye en los tiroides multinodulares.

En los carcinomas tiroideos la ecografía es útil para descubrir neoplasias ocultas cuando la manifestación inicial fue una metástasis extratiroidea y para diagnósticos de recidiva tras cirugía y/o radioyodo.

5.4.5. Gammagrafía tiroidea

La gammagrafía tiroidea constituía hace dos décadas la prueba de referencia en la valoración del nódulo tiroideo; actualmente la generalización de la PAAF para el diagnóstico citológico y la precisión de las hormonas tiroideas para detectar hiperfunción han originado un descenso en su utilización.

La gammagrafía permite diferenciar las áreas funcionales (o captantes) y no funcionales de la glándula. Se realiza utilizando como radiotrazador el tecnecio-99 metaestable aunque en ocasiones puede ser necesario el empleo de un isótopo del yodo (yodo-131 o yodo-123), más caro y más tóxico.

Según su comportamiento gammagráfico los nódulos tiroideos se clasifican en hipocaptantes o hipofuncionantes (nódulos “fríos”), isocaptantes o isofuncionantes (nódulos “templados”) o hipercaptantes o hiperfuncionantes (nódulos “calientes”), según que la captación del trazador sea, respectivamente, menor, igual o mayor que la del resto del parénquima tiroideo.

Aproximadamente un 16% de los nódulos fríos son malignos, mientras que sólo un 9% de los nódulos isocaptantes y menos de un 4% de los nódulos hipercaptantes son expresión de un cáncer de tiroides. Hay que tener en cuenta que aunque el carcinoma tiroideo habitualmente no capta el trazador,

una captación normal o aumentada no excluye este diagnóstico y por otro lado, los nódulos tiroideos solitarios se comportan generalmente como hipocaptantes y, sin embargo, la mayoría de ellos son benignos. Por ello, la gammagrafía tiroidea no puede diferenciar entre benignidad y malignidad (David E, 1995).

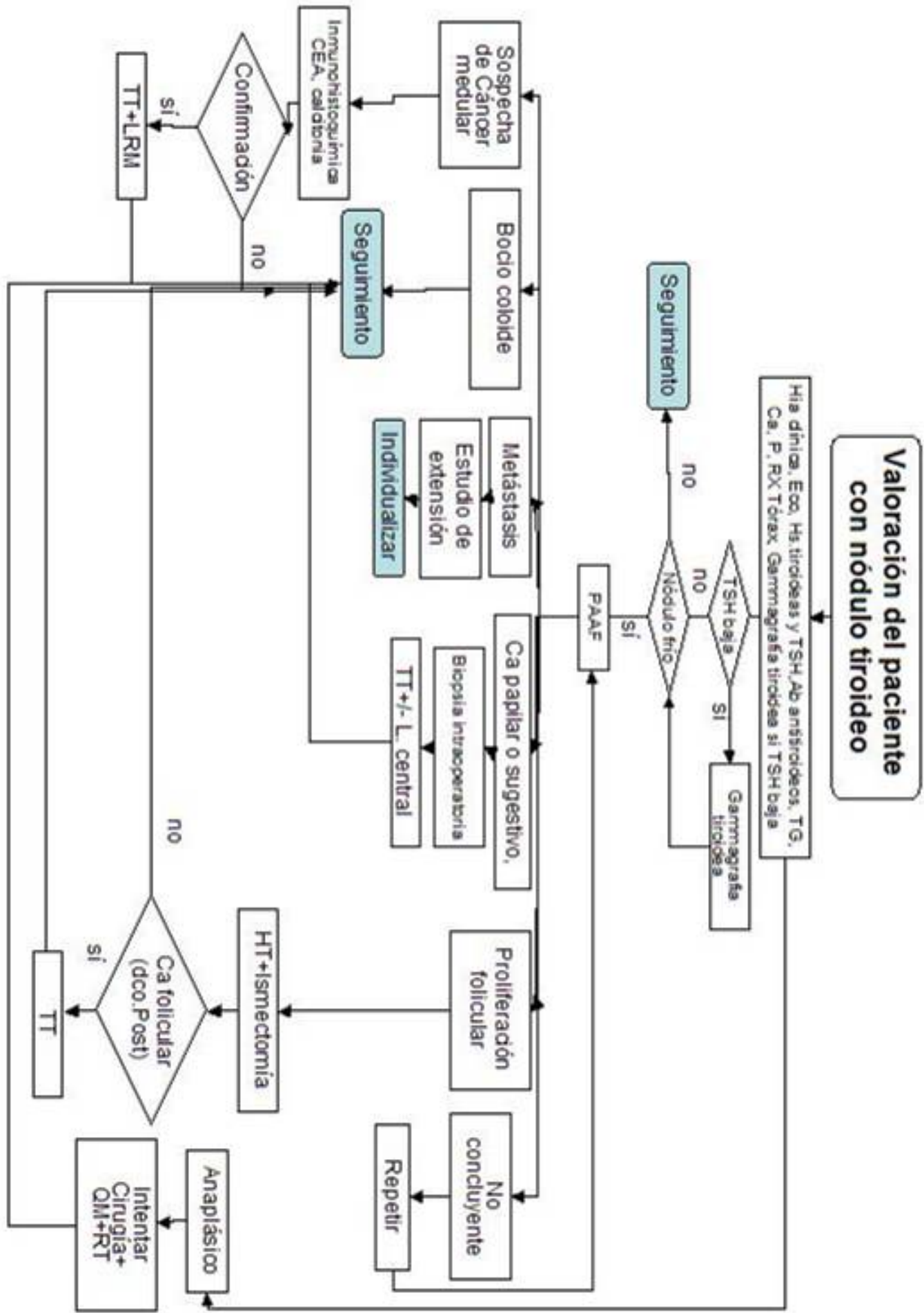
Actualmente, la gammagrafía puede jugar algún papel en el estudio de las tiroiditis, en los nódulos hiperfuncionantes y en nódulos altos de la línea media que requieren diagnóstico diferencial entre nódulo tiroideo, quiste tirogloso o adenopatía metastásica.

5.4.6. Terapia hormonal supresora como método diagnóstico

Se basa en la teoría clásica de la influencia de la TSH en el crecimiento del tejido tiroideo, aunque estudios recientes demuestran la importancia de otros factores distintos a la tirotropina en el desarrollo de los nódulos tiroideos. Se realiza administrando una dosis de tiroxina (L-T4) suficiente para frenar la secreción de TSH durante un tiempo suficientemente prolongado (de 3 a 6 meses) como para disminuir el tamaño del nódulo. Desde un punto de vista práctico, en los nódulos que crecen a pesar de una adecuada supresión, al igual que en los que no se modifican o disminuyen parcialmente se debe poner en duda la naturaleza benigna.

Sin embargo, la mayoría de los nódulos tiroideos benignos no disminuyen su tamaño con la terapia supresora y alrededor del 15% de los cánceres se reducen significativamente de tamaño por lo que la utilidad de este método de diagnóstico es limitada para la distinción de nódulos benignos frente a malignos (Reverter, 1992).

De manera esquemática, se propone el siguiente algoritmo sobre la valoración del paciente con nódulo tiroideo:



6. TUMORES TIROIDEOS

6.1.- CLASIFICACIÓN

De manera clásica, respecto a tumores de extirpe epitelial, se distingue entre tumores bien diferenciados y pobremente diferenciados (Hazard JB, 1964), como se puede apreciar en la **tabla 4**.

BIEN DIFERENCIADO	CARCINOMA PAPILAR	Adenocarcinoma papilar puro
		Adenocarcinoma Mixto Papilar y Folicular
	CARCINOMA FOLICULAR	Carcinoma Folicular Puro
		Carcinoma de Células Claras
		Carcinoma de células oxifílicas y Carcinoma Células Hurtle
	POBREMENTE DIFERENCIADO	CARCINOMA MEDULAR
CARCINOMA INDIFERENCIADO		Carcinoma de Células Pequeñas
		Carcinoma de Células Gigantes
CARCINOMA EPIDERMÓIDE		
OTROS TUMORES MALIGNOS	LINFOMAS	
	SARCOMAS	
	METÁSTASIS	

Tabla 4. Clasificación Clásica de los Tumores Tiroideos

Durante un largo tiempo, la clasificación más utilizada es la aceptada por la OMS en 1974 (Hendinguer C, 1974) basada en la de Woolner (Woolner LB,

1961), adaptada por Ron y Modan en 1982 y revisada en 1988 (Hendinguer C, 1989), que se expresa en la **tabla 5**.

TUMORES EPITELIALES	Carcinoma Papilar
	Carcinoma Folicular
	Carcinoma Medular
	Carcinoma Indiferenciado (anaplásico) De células fusiformes De células Gigantes De células Pequeñas
	Carcinoma de Células Escamosas
TUMORES NO EPITELIALES	Fibrosarcoma
	Otros sarcomas
LINFOMA MALIGNO PRIMARIO TUMORES MISCELÁNEOS TUMORES SECUNDARIOS TUMORES NO CLASIFICADOS TUMORES METASTÁSICOS	

Tabla5. Clasificación de los Tumores Tiroideos (OMS, 1988).

Carcinoma	1.- Papilar 2.- Folicular 3.- Células Hürthle 4.- Medular 5.- Anaplásico
Linfoma Tiroideo	
Tumor Benigno: Células Hürthle	

Tabla 6. Clasificación Tumores Tiroideos 2007.

Actualmente, la más novedosa es la clasificación de “Practice Guidelines in Oncology” publicada en el año 2007 por la NCCN-National Comprehensive Cancer Network.

T₀	Sin evidencia de tumor primario
T₁	Tumor ≤2cm en su dimensión máxima, limitado al tiroides T _{1a} : 1 cm o menos; T _{1b} >1cm pero < 2cm
T₂	Tumor >2 cm y <4 cm en su dimensión máxima y limitado al tiroides
T₃	Tumor >4cm en su dimensión máxima, limitado al tiroides o cualquier tumor con mínima extensión tiroidea (como la extensión al músculo esternotiroideo o a los tejidos blandos peritiroideos)
T₄	T_{4a} Tumor de cualquier tamaño que se extiende más allá de la cápsula tiroidea e invade los tejidos blandos subcutáneos, la laringe, la tráquea, el esófago o el nervio laríngeo recurrente
	T_{4b} El tumor invade la fascia prevertebral o engloba la arteria carótida o los vasos mediastínicos. Se considera T4 a todos los tumores anaplásicos
	T_{4a} carcinoma anaplásico intratiroideo (quirúrgicamente extirpable)
	T_{4b} carcinoma anaplásico extratiroideo (inoperable)
	Los ganglios linfáticos regionales son los de los compartimentos central y lateral del cuello y los del mediastino superior
N_x	No es posible evaluar los ganglios linfáticos regionales
N₀	Ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N₁	Metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N_{1a}	Metástasis al nivel VI (ganglios linfáticos pretraqueales, paratraqueales y prelaríngeos)
N_{1b}	Metástasis en los ganglios linfáticos cervicales o del mediastino superior unilaterales, bilaterales o contralaterales
	Metástasis a Distancia
M_x	No se puede evaluar las metástasis a distancia
M₀	Ausencia de metástasis a distancia
M₁	Metástasis a distancia

Tabla7. Clasificación TNM y estadio del carcinoma tiroideo

El sistema de estadiaje utilizado para la clasificación de tumores tiroideos es la TNM, que se basa en la valoración de 3 componentes:

T: extensión del tumor primario

N: presencia o ausencia de adenopatías

M: presencia o ausencia de metástasis a distancia

Estadios		
	<45 años	≥45 años
Estadio I	Cualquier T, Cualquier N, M0	T1, N0, M0
Estadio II	Cualquier T, Cualquier N, M1	T2, N0, M0
Estadio III		T3, N0, M0
		T1, N1a, M0
		T2, N1a, M0
		T3, N1a, M0
Estadio IVA		T4a, N0, M0
		T4a, N1a, M0
		T1, N1b, M0
		T2, N1b, M0
		T3, N1b, N0
		T4a, N1b, M0
Estadio IVB		T4b, Cualquier N, M0
Estadio IVC		Cualquier T, Cualquier N, M1

Tabla 8. Estadiaje de los Tumores Papilares Tiroideos

6.2.- INCIDENCIA Y MORTALIDAD.

El cáncer de tiroides constituye algo más del 1% de todos los cánceres (Sadler GP, 1999) (Hundahl SA, 2000). Es el tumor endocrino más frecuente (Mc Conahey WM, 1986), constituyendo hasta el 91'6% de los mismos.

La incidencia del cáncer de tiroides ha aumentado de manera constante en los últimos 20 años (Fahey TJ, 1995)(Christensen SB, 1984). Están claramente establecidos como factores etiológicos la exposición a radiación y las mutaciones RET, para los cánceres tiroideos no medulares y medulares respectivamente, pero no se han identificado causas para la mayoría de los tumores malignos de tiroides.

El aumento en la incidencia es más atribuible a la detección precoz del cáncer papilar de tiroides, que a un verdadero aumento en la incidencia de la enfermedad. El diagnóstico precoz parece deberse al incremento del uso de la ecografía, de la gammagrafía tiroidea con isótopos y de la punción aspiración con aguja fina (PAAF). Aunque la incidencia y prevalencia del cáncer de tiroides está aumentando, el ratio de mortalidad permanece muy bajo.

Aunque se puede diagnosticar cáncer de tiroides a cualquier edad, es más frecuente a partir de los 30 años, con una media de edad de diagnóstico de 47 años. La media de edad diagnóstica es menor en casos de tumores familiares medulares y es mayor para los casos de tumores anaplásicos (Kebebew, 2000).

En Estados Unidos en el año 2006 se diagnosticaron 30180 nuevos casos, de los cuales aproximadamente fueron 25500 de la estirpe papilar, 3000 de estirpe folicular y células de Hurthle, 1000 de estirpe medular y 500 de clase indiferenciado. Las mujeres desarrollaron 3 veces más un cáncer tiroideo de tipo diferenciado, y 2 veces más frecuente de la estirpe anaplásica (Jemal, 2006). La incidencia del cáncer medular parece similar en hombres y mujeres.

A nivel mundial, en el año 2002, se diagnosticaron aproximadamente 141000 nuevos casos de cáncer tiroideo (103589 en mujeres y 37424 en hombres), con una media aumentada para países como Australia, Estados Unidos, Japón, Nueva Zelanda y Centro América (sólo mujeres) (Parkin, 2005) media que era aún más elevada en Micronesia y Polinesia (Pisani, 1999). Sólo el 42% de las mujeres diagnosticadas residían en países en vías de desarrollo, el resto (60000), lo hacían en países desarrollados (Kamangar, 2006).

Existe gran variación en la prevalencia del cáncer de tiroides, dependiendo de la localización geográfica. Se ha observado una baja prevalencia en zonas como Polonia, con 1.4 y 0.4 casos por mil en las mujeres y los hombres, respectivamente. (Ain, 1995). Y la prevalencia es especialmente elevada en Hawái, con 8.1 y 1.4 casos por mil en las mujeres y los hombres respectivamente (De Diego, 1987).

6.3.- ETIOPATOGENIA.

6.3.1. Sexo, Edad y Raza.

Un extenso estudio realizado en Estados Unidos por Correa y Chen (Correa P, 1995) en el que se analizaron 13.903 casos de cáncer de tiroides, muestra que el carcinoma papilar y el folicular son algo más de dos veces más frecuentes, en mujeres que en hombres. Para otros autores (Sadler GP, 1999) el carcinoma papilar aparece más en mujeres, con una proporción 2 a 1 y el folicular en proporción 3 a 1. Otros autores, refieren que aparece un carcinoma papilar en tres mujeres por cada hombre. Granado (Granado A, 1975), en Madrid, encuentra un carcinoma papilar en un hombre por cada cuatro mujeres y uno folicular en un hombre por cada mujer. En Cádiz (García-Poley A, 1994), se observa que el carcinoma papilar es 3.7 veces más frecuente en mujeres y el folicular 5 veces. Mato (Mato A, 1996) encuentra un carcinoma papilar y uno folicular en cuatro mujeres por cada hombre.

La diferencia de incidencia por sexo se reduce en el caso del carcinoma medular (Sarda AK, 1990), en este sentido, esta relación es de 1.5:1 a favor de las mujeres. Otros autores encuentran un carcinoma medular en tres mujeres por cada hombre. El carcinoma anaplásico es 1.5 veces más frecuente en mujeres. Otros autores como Granado y Ventakesh (Ventakesh YS, 1990) encuentran un carcinoma anaplásico en dos mujeres por cada hombre y García-Poley, en cuatro mujeres por cada hombre. El linfoma es entre 2 y 2.7 veces más frecuente en mujeres (Derringer GA, 2000).

Aunque el cáncer de tiroides puede aparecer en cualquier edad, es evidente que los carcinomas diferenciados aparecen preferentemente en edades intermedias de la vida, mientras que los indiferenciados aparecen, sobre todo, a partir de la séptima década de la vida (Santamaría J, 1986). El cáncer de tiroides aparece con más frecuencia entre los 25 y los 65 años. Este

intervalo de edad varía según el tipo histológico, aunque no es raro la aparición de éstos en edades extremas de la vida (McClellan DR, 1996).

Cerdá (1999) encuentra que el 46% de los menores de 14 años intervenidos por nódulo tiroideo, presentan un cáncer, que en el 85% de los casos es un carcinoma papilar. La incidencia de cáncer de tiroides en niños es de 0.2 a 5 casos por millón y año y representa el 1.4% de todos los cánceres infantiles. El 10% de los cánceres de tiroides se pueden dar en menores de 21 años. En individuos jóvenes, el 70% de los carcinomas tiroideos afectan al sexo femenino (La Quaglia MP, 2000).

El carcinoma papilar de tiroides presenta una incidencia aumentada entre 15 y 19 años, con un pico entre 30 y 34 años, descendiendo ésta a partir de los 70 años. La edad media del carcinoma papilar se sitúa entre 30 y 40 años (Balibrea Cantero JL, 1994).

Existe un aumento de la incidencia del carcinoma folicular entre la pubertad y los 45-49años, con un segundo pico de incidencia alrededor de los 75 años (Correa P, 1995). La edad media de aparición del carcinoma folicular ronda los 50 años. Mato sitúa la edad media de aparición del carcinoma folicular en 55 años. García-Poley en un estudio realizado en la provincia de Cádiz, encuentra la edad media de aparición del carcinoma folicular para las mujeres de 41.4 años y para los hombres de 35.5 años.

El carcinoma medular de tiroides esporádico aparece con mayor frecuencia en la quinta o sexta década de la vida (Dunn JM, 1993), mientras que el asociado a síndromes genéticos, aparece en edades más tempranas (Cerdá J, 1999) y presenta una frecuencia máxima entre la segunda y la cuarta década de la vida. García-Poley sitúa la edad media de aparición del carcinoma medular en 46 años para los hombres y en 60.3 años para las mujeres.

Los tumores indiferenciados aparecen con preferencia en personas mayores de 50 o 60 años. En Cádiz se sitúa la edad media de aparición del carcinoma anaplásico en 52 años para los hombres y en 68.6 para las mujeres.

La mayoría de los pacientes con linfoma tiroideo son ancianos y su edad de aparición oscila entre 50 y 80 años (Matsuzuka F, 1990).

6.3.2. Radiaciones Ionizantes.

Existe una clara evidencia entre la exposición a radiaciones ionizantes y el aumento en incidencia de carcinomas, debido al daño que pueden provocar estas radiaciones a nivel del DNA (Little JB, 2000). Esta incidencia es mayor para el cáncer de tiroides que para otros tumores sólidos, por lo que se ha sugerido que la glándula tiroides es más radiosensible que otros órganos (Ron E, 1995).

La exposición a radiaciones ionizantes es el único factor de riesgo ambiental establecido, siendo verificado en numerosos estudios. Entre ellos se encuentran los supervivientes de la bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki, el accidente de la central nuclear de Chernobyl, individuos expuestos a fuentes de radiación médica (Nagataki, 2002). Se ha constatado que el 6.7% de los individuos expuestos a las explosiones atómicas han desarrollado cáncer (Sampson, 1969). Este aumento de incidencia de carcinoma tiroideo, sobre todo en niños, también se ha comunicado a raíz del desastre de la central nuclear en Chernobyl y en zonas donde se han ensayado explosiones atómicas como las Islas Marshall. Se ha comunicado la aparición de tumor tiroideo en pacientes que fueron tratados con radioterapia por otras neoplasias (Werner 1995).

La exposición a radiaciones y la posibilidad de desarrollo de cáncer de tiroides, tiene mayor significación si tiene lugar en edad prepuberal, y en especial para el carcinoma papilar. Menor influencia presenta en la aparición de formas foliculares (Korff, 1981).

En adultos puede aparecer el tumor tiroideo muchos años después de la exposición, con un riesgo máximo a los 30 años, aunque el período de latencia es variable (Saavedra Vallejo, 1997). La susceptibilidad a desarrollar cáncer de

tiroides es mayor si se recibe la radiación en la infancia y va disminuyendo con la edad.

6.3.3. Relación entre Bocio y Cáncer de Tiroides.

El déficit de yodo o la exposición a bociógenos durante mucho tiempo, induce al desarrollo de carcinoma tiroideo en animales de experimentación (Schaller 1966).

No es fácil establecer una relación entre bocio y cáncer de tiroides, debido a la existencia de diferentes niveles de desarrollo socio-sanitario en las distintas zonas de estudio, con distinta accesibilidad a las redes sanitarias y diferentes criterios a la hora de abordar, desde el punto de vista quirúrgico, la patología tiroidea. En las zonas no endémicas de bocio, se suele intervenir más rápido ante la aparición de un bocio (De Diego, 1987).

Aunque para muchos autores no existen datos concluyentes de que la incidencia global de cáncer de tiroides sea diferente en las zonas de bocio endémico, la mayoría ha detectado un aumento del carcinoma folicular y anaplásico en estas zonas (Galanti MR, 1995).

En una amplia revisión bibliográfica De Diego y Jara (De Diego 1987), no encuentran diferencias entre las series de mortalidad por cáncer de tiroides entre zonas endémicas de bocio y no endémicas, salvo en Suiza y Austria que presentan mayores índices de mortalidad. Se incluyen en este estudio datos obtenidos en nuestro país de incidencia de cáncer de tiroides en zonas bociógenas de Navarra y de baja incidencia de bocio (Tarragona y Zaragoza). Por otro lado, Löhrs encuentra una mayor mortalidad por cáncer en Baviera, zona endémica de bocio respecto a otras regiones no endémicas de bocio.

Algunos autores sugieren que la disminución del bocio endémico mediante yodo-profilaxis ocasiona una menor agresividad en el comportamiento biológico del cáncer por el cambio del tipo histológico y por la

disminución de la frecuencia de estadios tumorales avanzados dentro de un mismo tipo histológico (Riccabonna 1983). La yodoprofilaxis induce un cambio en la distribución de los tipos histológicos, aumentando la frecuencia relativa del carcinoma papilar, frente al folicular y al anaplásico (Bubenhefer, 1985).

Löhrs en una región endémica del sur de Alemania, detecta un progresivo aumento del tipo papilar del cáncer de tiroides, pero no cree que se deba a la yodoprofilaxis, que no se realiza de forma sistemática, sino a la mejora del nivel de vida que conlleva una mejora en la alimentación, que repercute en una mayor ingesta de yodo.

Por lo tanto, aunque parece existir una mayor proporción de carcinoma papilar en zonas de baja prevalencia de bocio y de carcinoma folicular y anaplásico en zonas de alta prevalencia del mismo, existen numerosos estudios que no encuentran relación entre la incidencia de los distintos tipos histológicos de carcinoma tiroideo y la prevalencia de bocio.

6.3.4. Predisposición familiar y asociación con síndromes genéticos.

Está demostrada la predisposición familiar a la aparición del carcinoma medular de tiroides (Hemminki, 2000), hay evidencias de que puede existir en el carcinoma papilar (Wymfor, 1995), y es muy discutible su influencia sobre la aparición del carcinoma folicular y anaplásico.

Aproximadamente un 5% de pacientes con cáncer tiroideo refieren tener una historia familiar de este tipo de tumor. Varios síndromes familiares están asociados con una mayor prevalencia de tumores tiroideos medulares y no medulares, entre los que se encuentran la Neoplasia Endocrina Múltiple (MEN) tipos 2A y 2B, el Carcinoma Familiar Medular de Tiroides (FMTC), el Síndrome de Werner, la Poliposis Adenomatosa Familiar y el Síndrome de Cowden (Nagy R, 2004).

Diversas alteraciones genéticas se han asociado a la aparición de carcinomas tiroideos. Los tumores tiroideos son clonales y en ellos hay una serie de defectos moleculares en el oncogen RAS. El oncogen PTC, que resulta de la activación del oncogen RET, ha sido detectado en el 25% de los carcinomas papilares.

Se han descrito seis mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis tiroidea. Cinco de ellos actúan sobre oncogenes estimuladores y el sexto sobre oncogenes supresores, en concreto en p53 (Basolo, 1997). Dos de los cinco mecanismos estimuladores, actúan sobre mecanismos responsable de la activación de la vía de cAMP (receptor de la TSH y proteína G- α s) (Saavedra Vallejo, 1997). Los otros dos mecanismos actúan sobre oncogenes estimuladores que codifican receptores de factores de crecimiento (RET y RTK). Por último, otro mecanismo actúa sobre el oncogén que codifica una proteína G traductora del citoplasma (RAS).

Las mutaciones del proto-oncogén RET están bien documentadas respecto a su función en el desarrollo del cáncer medular de tiroides. Las mutaciones germinales del oncogén RET (cromosoma 10) se transmiten de manera autosómica dominante y son responsables de aproximadamente un 25% de los carcinomas medulares de tiroides (Komminoth, 1997).

En la génesis del carcinoma papilar, el oncogén RET se activa por una traslocación o una inversión a nivel del intrón 11, produciéndose un gen híbrido que en el 60% de los casos es el denominado PTC1 (en el resto de casos, los denominados PTC2 y PTC3).

Se sabe que el PTC1 se puede inducir por radiaciones ionizantes (Hemminki, 2000). El oncogén RET también se puede activar por una mutación en los exones 10 y 11 (dominio extracelular del receptor) o en el segundo dominio tirosino-quinasa. Si la mutación ocurre en células somáticas se dará lugar al carcinoma medular esporádico y si ocurre en las células germinales, a un Síndrome MEN2. Existe una fuerte correlación genotipo-fenotipo entre la

mutación germinal del oncogén RET y el fenotipo del MEN tipo 2A, MEN tipo 2B o el FMTC.

Las mutaciones de células germinales de los oncogenes WRN, APC y PTEN, están asociadas a Síndrome de Werner, Poliposis Adenomatosa Familiar y Síndrome de Cowden, respectivamente (Eng, 2003). En estos tres tipos, desarrollan cáncer de tiroides una pequeña minoría en el caso del Síndrome de Werner, un 3% aproximadamente en la Poliposis Adenomatosa Familiar, y alrededor de un 10% de los pacientes con Síndrome de Cowden (Alsanea, 2001).

La mutación de los oncogenes H, N y K-RAS (cordones 12, 13 o 61), se encuentra de forma temprana en todo tipo de tumores foliculares, desde los benignos, como el adenoma folicular a los malignos, como el carcinoma folicular y el anaplásico, lo cual evidencia su participación en la génesis de los tumores (Saavedra Vallejo, 1997).

6.3.5. Susceptibilidad Genética.

Aunque la exposición a radiación ionizante y las mutaciones de células germinales están establecidas como factores de riesgo en carcinomas tiroideos, la mayoría de pacientes con este tipo de tumores, no tienen en su historia clínica datos sobre radiaciones ni síndromes genéticos asociados. Sin embargo, en nuestra vida diaria actual, estamos expuestos a otro tipo de mecanismo que daña el DNA, como es la oxidación, que puede causar un daño similar al de la radiación en nuestro DNA.

Estudios emergentes, hablan de la posibilidad de grupos de pacientes con una mayor susceptibilidad a bajos niveles de radiación ó daño similar en DNA, y que esta susceptibilidad podría ser hereditaria o genética en su origen.

Diferencias sutiles en la habilidad individual para metabolizar carcinógenos ambientales, reparar daños de DNA provocados por

carcinogenes endógenos ó exógenos, y controlar de manera eficiente el ciclo celular y la apoptosis, todo ello como consecuencia del polimorfismo genético de cada individuo, han sido sugeridos como factores modificadores de la susceptibilidad individual hacia carcinomas esporádicos.

6.3.6. Inestabilidad Genómica.

La inestabilidad cromosómica juega un papel fundamental en los carcinomas bien diferenciados de tiroides. Esta inestabilidad ha sido identificada en adenomas foliculares y carcinomas foliculares, en los cuales es de tipo aneuploide y existen delecciones heterocigóticas de regiones con cromosoma múltiple.

Por el contrario, en la mayoría de los carcinomas papilares de tiroides, esta inestabilidad es diploide y tiene menos delecciones heterocigóticas (Castro MR, 2003)

Se conoce ampliamente que los tumores se desarrollan como resultado de alteraciones genéticas o genómicas entre las que se incluyen amplificaciones, delecciones, traslocaciones y cambios epigenéticos.

El análisis de los cambios genéticos moleculares dirige hacia la identificación de oncogenes y genes supresores tumorales. Los estudios sobre estas alteraciones son esenciales para comprender las bases moleculares del cáncer y pueden proporcionar marcadores diagnósticos y pronósticos potenciales, y con ellos, los objetivos terapéuticos del cáncer.

Entre los métodos utilizados se encuentran “hibridación genómica comparada (CGH), cariotipo espectral, citogenética convencional y molecular, análisis de microsatélites (p. ej. pérdida de heterocigosidad-LOH), estudio de polimorfismos de nucleótidos único (SNPs) y pirosecuenciación.

La pirosecuenciación es un método de secuenciación cuantitativa basado en la detección a tiempo real de pirofosfato, el cual se obtiene a través de la introducción de nucleótidos en una reacción de secuenciación-síntesis. El análisis de pirosecuenciación ofrece la posibilidad de cuantificar alelos.

6.4.- FORMAS ANATOMOCLINICAS

6.4.1. Carcinoma Papilar.

Es el más frecuente de todos los tumores tiroideos, constituyendo entre el 65%-80% de los mismos (Balibrea Cantero, 1994). En un estudio multicéntrico publicado y realizado en hospitales de Estados Unidos y Alemania (Holzer, 2000), el carcinoma papilar constituye el 66.4% de los cánceres tiroideos.

El 94% de los carcinomas de tiroides son diferenciados, incluyendo la estirpe Papilar y la Folicular. Su incidencia está íntimamente ligada a la exposición a radiaciones. En conjunto, el pronóstico es bastante bueno, con una supervivencia a 10 años superior al 90%. Su tratamiento se realiza con resección quirúrgica junto con yodo radiactivo adyuvante y terapia farmacológica para controlar los niveles de TSH (Sherman 2003).

El carcinoma papilar está frecuentemente caracterizado por una reordenación de células somáticas o la activación de los proto-oncogenes RET o BRAF, respectivamente (Fagin 2004). Menos común es la reordenación del NTRK1 (receptor neurotrófico tirosin-quinasa tipo 1) (Carnita 2003). Mutaciones de células germinales en el gen supresor de tumor PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10), son las responsables del Síndrome de Cowden; caracterizado por una transmisión autosómica dominante que predispone para tumores benignos y malignos de la glándula tiroidea y otros órganos.

Se caracteriza por un patrón ramificado, por el estroma fibro-vascular axial papiliforme, y su tamaño puede variar desde focos microscópicos hasta varios centímetros (Robbins 1995).

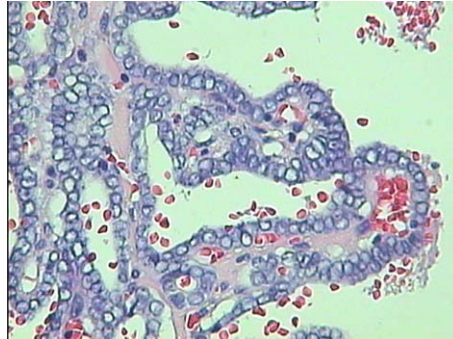


Figura 14. Histología del Carcinoma Papilar

Las lesiones papilares de aspecto benigno están recubiertas por una capa única de epitelio cúbico. Algunas papilas se seccionan transversalmente y ofrecen una imagen en islotes aislados. En las lesiones malignas pueden observarse atipias en grado variable y las células están orientadas de una forma más anárquica. A veces, existen incluso importantes cambios en el aspecto histológico entre campos contiguos. Se observa también la invasión del pedículo y de la cápsula, y no es infrecuente el acúmulo de células.

En la mitad de los casos, el núcleo adopta un aspecto “en vidrio esmerilado” característico (Selzer, 1977). Las membranas nucleares está bien delimitadas, pero los nucleolos y la cromatina nuclear, presenta un aspecto difuminado.

El 50% de los casos presenta una lesiones muy características denominadas *cuerpos de Psamoma*, que consisten en unas formaciones esféricas calcificadas y laminadas de dimensiones variables hasta 0.1 mm y que suelen estar situados en el estroma fibroso de la punta de las papilas. Estas formaciones pueden ser visibles en los estudios radiológicos.

Se distinguen los microcarcinomas mínimos u ocultos, los tumores intratiroideos y los tumores extratiroideos (Sadler 1999). Se considera

microcarcinoma cuando su diámetro oscila entre 5 y 15mm, sin evidencia de invasión local a través de la cápsula glandular y sin metástasis a ganglios linfáticos. Para algunos autores, el límite está en 10mm. Se consideran tumores intratiroideos, aquéllos que se limitan a la glándula y no presentan evidencia de invasión extra-tiroidea. Sí existe invasión en los tumores extratiroideos.

El carcinoma papilar es multicéntrico en el 20-80% de los casos y la invasión extratiroidea ocurre entre el 10-35% de casos, pudiendo afectar a la tráquea, esófago y nervios laríngeos recurrentes. Las metástasis a distancia son poco frecuentes en el momento del diagnóstico y se constatan en menos del 15% de los casos (Sadler 1999).

6.4.1.1. Variedades poco frecuentes del Carcinoma Papilar.

A) Carcinoma Papilar de Células Altas.

Representa aproximadamente el 10% de los carcinomas papilares. Se caracteriza por la formación de papilas extensas con células rectangulares de citoplasma granular y acidófilo, con características oncocíticas. Tienen comportamiento agresivo de manera local, presentando invasión vascular en el 25% de los casos. Al momento del diagnóstico, el tumor suele ser de mayor tamaño (3-4cm de media) que el carcinoma papilar y con más frecuencia que en éste, existe invasión extratiroidea. Aparecen metástasis ganglionares precoces en el 50% de los casos, y metástasis a distancia en el 20%.

Con respecto al carcinoma papilar, es un tumor más frecuente en varones, en edad más avanzada y la mortalidad a los cinco años es muy superior, ascendiendo al 25% de los casos. La causa de muerte suele ser la recidiva local con afectación de la vía aérea o a distancia, sobre todo pulmón o pleura.

Estos tumores son captantes de Yodo radiactivo y responden a la TSH, por lo que el tratamiento de elección se considera quirúrgico, seguido de I¹³¹ y supresión con hormona tiroidea.

B) Variante Columnar del Carcinoma Papilar.

Es una variedad poco frecuente afectando principalmente a varones. Suele alcanzar un gran tamaño en el momento del diagnóstico, de comportamiento agresivo y con tendencia a la invasión local. Presentan una elevada mortalidad a los pocos años (90%) (Burman 1996).

Histológicamente se caracteriza por la presencia de células rectangulares y estratificadas, de citoplasma claro y en ocasiones vacuolización subnuclear.

C) Esclerosis Difusa.

Es una forma característica de niños y adolescentes, constituyendo el 3% de los carcinomas papilares. La forma de presentación clínica consiste en un bocio que afecta a ambos lóbulos tiroideos, sin existir a veces una masa dominante. La mayoría de los pacientes presentan adenopatías en el momento del diagnóstico y el 25% de ellos, posee metástasis pulmonares (Robbins J, 1991).

Desde el punto de vista histológico, se caracterizan por una afectación difusa de uno o los dos lóbulos tiroideos con una esclerosis densa y un componente inflamatorio inespecífico. Existe metaplasma escamosa y gran cantidad de cuerpos de Psamoma.

D) Variedad Folicular Difusa.

Aparece en pacientes jóvenes y constituye el 3% de los carcinomas papilares. Un tercio de los casos presenta hiperfunción tiroidea y el diagnóstico

diferencial con la enfermedad de Graves puede resultar dificultoso, al existir una glándula aumentada de manera difusa. Posee una evolución agresiva, más que la del carcinoma papilar (Samaan 1990).

Histológicamente, se caracteriza por la infiltración difusa de tumor de patrón folicular y con hallazgos característicos del tumor papilar. Las metástasis ganglionares poseen morfología de tumor papilar bien diferenciado.

6.4.2. Carcinoma Folicular.

Representa alrededor del 15-20% de los tumores tiroideos. En un estudio multicéntrico publicado por Holzer, se advierte que el 27.2% de los carcinomas de tiroides, son foliculares (Holzer, 2000).

Se asocia con mutaciones de células somáticas del gen RAS. Se ha encontrado una activación del gen RAS en un 40% de los adenomas foliculares y en algo menos de los carcinomas foliculares de tiroides (Rogounovitch, 2006).

En las neoplasias tiroideas se han encontrado mutaciones del codón 61 del HRAS y NRAS. Las mutaciones del gen RAS son más frecuentes en áreas con déficit de yodo, y se ha observado que son poco frecuentes en los carcinomas tiroideos relacionados con casos del desastre nuclear de Chernobyl (Suchy 1998).

Existen casos de carcinoma folicular tiroideo que no presentan mutaciones del gen RAS. En éstos, se ha encontrado un reordenamiento entre el PAX8 y el PPAR γ . El PAX8 es un factor de transcripción genético. El PPAR γ , un peroxisoma proliferante del receptor y activado (McIver 2004).

Estas mutaciones somáticas se observan en un 25-70% de los tumores foliculares del tiroides y llevan a una transcripción anormal que forma un factor derivado de la fusión de genes del PAX8 y del PPAR γ , el cual conlleva una

inhibición del factor de transcripción de PPAR γ . Estos cambios se encuentran solamente en las variantes de adenoma folicular tiroideo (0-31%) y carcinoma folicular tiroideo (25-63%) (Nikiforova 2003).

El aspecto microscópico es de un adenocarcinoma con una gran variabilidad en las dimensiones y la diferenciación de las formaciones glandulares o foliculares, de manera que encontramos formaciones embrionarias muy pequeñas abortivas o folículos con glándulas muy delimitadas y con coloide, difíciles de diferenciar de la histología normal.

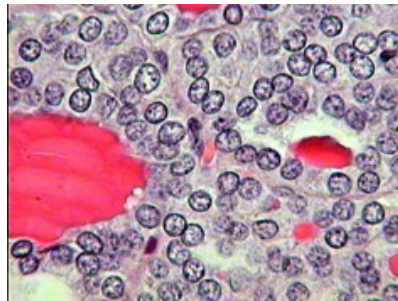


Figura 15. Histología del Carcinoma Folicular

La capacidad invasiva también es muy variable, pudiendo afectar a la cápsula, sobrepasarla o destruirla. Puede invadir vasos sanguíneos, lo que le diferencia del carcinoma papilar, y le proporciona la capacidad de metastatizar a distancia por vía hemática (Robbins 1995).

La frecuencia de los carcinomas foliculares multicéntricos es baja, así como su aparición en forma de carcinoma oculto. Hay descritos casos de carcinomas foliculares diagnosticados al detectar metástasis (Rodríguez Carballeira, 1995).

6.4.2.1. Carcinoma de Células de Hürthle.

Es considerado como una variante del carcinoma folicular, pero además puede aparecer de forma rara en algunos tumores papilares (Hundahl, 2000). Representa entre el 3-5% de las neoplasias malignas del tiroides y el 20% de

los pacientes con carcinoma folicular (Har-El-G, 1986). Son tumores multifocales y bilaterales con más frecuencia que el carcinoma folicular y aparecen más frecuentemente en la quinta década de la vida y en mujeres.

Desde el punto de vista histológico, el 75% de sus células presentan un citoplasma granular y acidófilo por la abundancia de mitocondrias. Derivan del epitelio folicular y se denominan **oncocitos, células oxifílicas o de Askanazy**, además pueden encontrarse en diferentes procesos benignos que cursan con hipertiroidismo, bocios nodulares y en tiroiditis de Hashimoto.

El diagnóstico diferencial con los adenomas foliculares es difícil, ya que estas células pueden estar presentes en lesiones benignas de tiroides. Los núcleos celulares pueden ser grandes y atípicos, a veces con nucleolo prominente. Esta dificultad para establecer el diagnóstico de benignidad o malignidad, obliga a considerar otros factores como la invasión vascular o de la cápsula (Robbins 1995).

6.4.3. Carcinoma Medular.

Representa entre el 5-10% de todas las neoplasias malignas del tiroides. Para Balibrea (Balibrea Cantero 1994), supone un 6%. En un estudio publicado por Hundal (Hundal, 2000), el carcinoma esporádico medular supone el 2.7% de los tumores tiroideos y el familiar el 0.5% de los mismos. Holzer encuentra un 2.8% de carcinomas medulares.

De entre todos los carcinomas medulares, el 70% son de tipo esporádico y el 30% de tipo familiar o asociados a síndromes endocrinos múltiples (MEN). En el síndrome MEN IIA, el carcinoma se asocia a feocromocitoma y a veces a hiperplasia paratiroidea, heredándose de forma autosómica dominante (Dunn, 1993). En el síndrome MEN IIB aparece el carcinoma medular de tiroides, feocromocitoma y se asocian con neurinomas mucosos, y a veces, con síndrome de Marfan. Esta forma familia posee un tipo de herencia autosómica dominante, y puede aparecer antes del primer año de vida. Los pacientes con

síndrome MEN IIA pueden asociar enfermedad de Hirschprung y liquen cutáneo con amiloidosis.

El 75% de los tumores medulares son únicos. Los tumores medulares esporádicos suelen ser únicos, mientras que los asociados a síndromes endocrinos múltiples, suelen ser multicéntricos y bilaterales hasta en el 90% de los casos (de la Torre, 1988).

Histológicamente, derivan de células parafoliculares C de origen neuroseretor localizadas dentro de los acinos tiroideos y entre ellos, clasificadas dentro de los tumores del sistema APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxilation) y provenientes de los cuerpos braquiales del cuarto y quinto saco braquial.

El carcinoma medular se caracteriza por la presencia de depósitos de amiloide y la capacidad de secreción de sustancias polipeptídicas, de forma que hasta el 90% de los tumores medulares pueden segregar calcitonina, lo que ha motivado incluso la realización de búsquedas sistemáticas en la población de este tumor mediante la determinación de calcitonina por radioinmunoensayo.

En otras ocasiones, pueden segregar histamina, prostaglandinas, que pueden producir diarreas; ACTH, que puede dar lugar a Síndrome de Cushing hasta un 4% de los pacientes; serotonina que puede dar lugar a un síndrome carcinoide (Paccini, 1991).

Estas neoplasias presentan una gran variabilidad histológica. Pueden aparecer células esféricas o poligonales que se asemejan a los tumores de células endocrinas y a veces las células pueden ser fusiformes de aspecto sarcomatoso. Las células se disponen en nidos de aspecto pseudo-papilomatoso rodeados de estroma fibrovascular con abundante contenido amiloide, el cual se tiñe con rojo congo y produce fluorescencia verdosa a la luz polarizada. La gran variabilidad histológica provoca dificultades diagnósticas si no se utilizan técnicas inmunohistoquímicas. El tumor es positivo para marcadores panendocrinos (ACE, Enolasa Neuro-Específico, cromogramina) y generalmente, negativo para tiroglobulina (Hanna 1997).

6.4.4. Carcinoma Indiferenciado.

Para algunos autores supone el 1% de todos los tumores tiroideos, otros autores como Hundahl encuentran un 1.7% de tumores indiferenciados (Hundahl, 2000).

Presentan un comportamiento muy agresivo, de forma que en el momento del diagnóstico suele haber afectación de órganos adyacentes. Es característica la invasión extracapsular y de los vasos sanguíneos, con focos de necrosis e infarto, por el rápido crecimiento.

Pueden presentarse como carcinomas de células pequeñas, constituidos por células cúbicas o poligonales muy unidas entre ellas, que se pueden disponer en cordones o en acúmulos, separados por un estroma fibroso con abundantes mitosis y atipias celulares. Una variedad de éstos, presenta células pequeñas y núcleos redondeados, muy parecidas a los linfocitos, por lo que el diagnóstico diferencial con el linfoma se hace difícil. También puede presentarse como carcinoma de células gigantes, caracterizado por células muy voluminosas pleiomórficas con núcleos abundantes y multilobulados. Otras veces las células son alargadas o fusiformes (Sadler, 1999).

6.4.4.1. Carcinoma Insular.

Representa el 5% de los cánceres tiroideos y afecta generalmente a individuos mayores de 50 años. Suele debutar con una masa en el cuello, de más de 4 o 5cm, que puede acompañarse o no de síntomas compresivos. En el momento del diagnóstico, el 44% de los pacientes tienen diseminación regional de la enfermedad y el 16% metástasis a distancia. Su comportamiento suele ser agresivo. Las recurrencias y las metástasis a distancia son más frecuentes que en los carcinomas diferenciados y su mortalidad mayor (Burman 1996). Su comportamiento biológico se encuentra entre el bien diferenciado y el anaplásico. La ablación con yodo es un tratamiento eficaz tras la cirugía.

6.4.4.2. Carcinoma de Células Grandes.

Aparece más frecuentemente en pacientes de edad avanzada. Suele presentarse clínicamente como una masa cervical de crecimiento rápido, generalmente adherido a estructuras vecinas. Es frecuente la aparición de síntomas compresivos, disfagia, dolor, síndrome de vena cava, obstrucción de vía aérea e incluso impide la realización de traqueotomía. Provoca metástasis a distancia con facilidad. Los pacientes cuyos tumores no han afectado a estructuras vecinas, tienen mejor supervivencia que aquéllos que tienen infiltradas estructuras adyacentes al tiroides, aunque, en todo caso, la supervivencia media no supera un año (Burman 1996).

El tratamiento de elección es la cirugía precoz y radical. En casos muy avanzados, la cirugía permite una mejor calidad de vida de los pacientes. Se recomienda el uso de radioterapia y la quimioterapia, aunque son poco eficaces (Aldinger, 1978).

6.4.5. Carcinoma de Células Escamosas.

Supone un 1% de los tumores tiroideos y su histogénesis es objeto de controversia, ya que el tiroides no posee células escamosas y cuando aparecen suele ser por una persistencia de restos del conducto tirogloso o porque existe una tiroiditis de Hashimoto con metaplasia escamosa del epitelio folicular. En el estudio microscópico, suele coexistir con zonas de carcinoma diferenciado y con zonas de tiroiditis (Simpson 1988).

Con frecuencia aparecen en varones, con historia previa de bocio. Estos pacientes sufren un repentino aumento de síntomas compresivos y un progreso rápido de la enfermedad. A veces pueden existir síntomas sistémicos como hipercalcemia, fiebre y leucocitosis (Riddle, 1987). El tratamiento de elección es la cirugía. La aplicación de yodo radiactivo y supresión hormonal son poco eficaces.

6.4.6. Linfoma Tiroideo Primario.

Supone entre el 1-4% de las neoplasias malignas del tiroides (Pera, 1991) y se caracteriza por la existencia de lesiones linfoepiteliales, con folículos tiroideos invadidos por linfocitos característicos, similares a los centrocitos (centrocito-like) que coexisten con una tiroiditis de Hashimoto en el tejido peritumoral. Pueden ser de alto, medio o bajo grado, dependiendo de ello la capacidad de infiltrar estructuras adyacentes (Isaacson 1985). Hasta el 80% de los pacientes presenta una tiroiditis crónica linfocitaria de Hashimoto. La mayoría de los linfomas tiroideos son linfomas no Hodgkin de células tipo B y se presentan en estadio IE ó IIE, según la clasificación de Ann Arbor (Derringer, 2000).

El 100% de los pacientes presenta bocio que suele ser de crecimiento rápido. Los pacientes son eutiroideos en el 58% de los casos y clínicamente hipotiroideos en el 27%, dependiendo del parénquima tiroideo destruido. El 14% de los pacientes presenta hipotiroidismo subclínico, en 68% tiene anticuerpos antimicrosomales y el 34% anticuerpos antitiroglobulina (Matsuzuka, 1993).

Es importante un diagnóstico y tratamiento precoz. La ecografía puede ser orientativa si se visualiza una imagen de pseudoquiste. La PAAF ofrece buenos resultados. El tratamiento de elección es la cirugía asociada con quimioterapia y radioterapia, lo que, en algunas series ofrece supervivencias del 100% a los 8 años (Matsuzuka, 1993).

6.4.7. Carcinoma Metastático.

La glándula tiroidea es asiento de metástasis procedentes, sobre todo, de tumores pulmonares, mamarios, melanomas y renales (Czech, 1982). En algunas series se destaca el renal como el origen más frecuente de metástasis en el tiroides (33% de los casos) (Nakhjavani, 1997), seguida del pulmón (20% de los casos), de la mama (16% de los casos), del esófago (9% de los casos) y del útero (7%).

7. CIRUGÍA TIROIDEA

7.1.- INTRODUCCIÓN

La glándula tiroidea es susceptible de muchas enfermedades, benignas y malignas, con producción de enfermedades metabólicas, auto inmunes, infecciosas e inflamatorias. Desde hace muchos años, el cirujano ha estado involucrado en el tratamiento de la mayoría de estas enfermedades pero conforme ha ido creciendo el progreso de las técnicas diagnósticas y terapéuticas de las enfermedades tiroideas, las indicaciones quirúrgicas han evolucionado.

Los nódulos tiroideos han constituido un verdadero problema de salud a lo largo de la historia de la medicina y en la actualidad la indicación más frecuente de cirugía tiroidea es la enfermedad nodular o multinodular.

Debido a la introducción de la sal yodada en los procesos de elaboración de los alimentos, ha habido un progresivo descenso en la incidencia del bocio multinodular desde la década de los años setenta. No obstante, se siguen viendo pacientes con grandes bocios que descienden hacia el mediastino. Salvo contraindicaciones concretas, todos estos pacientes deberán ser tratados quirúrgicamente.

Clínicamente se puede manifestar como un nódulo cervical palpable, generalmente indoloro, único o en el seno de un bocio multinodular, asociado o no a linfadenopatía cervical. En otras ocasiones se identifica un nódulo no palpable a nivel tiroideo en el transcurso de una ecografía tiroideo u otras pruebas de imagen a nivel cervical (TAC, Eco-Doppler). Pueden mostrar síntomas compresivos (disfonía, disfagia) que depende de la extensión y agresividad del tumor.

En el diagnóstico del cáncer de tiroides, generalmente presentado como enfermedad nodular, ha contribuido especialmente la utilización sistemática de la punción con aguja fina, ya que la gammagrafía no es específica (la mayoría de los nódulos benignos y malignos son “fríos”) y la ecografía, aunque diferencia entre nódulo sólido o quístico, no saca de dudas ya que la naturaleza quística de algunos nódulos no indica necesariamente benignidad.

El diagnóstico definitivo sigue siendo el histológico. El estudio genético en ciertas mutaciones en formas hereditarias del carcinoma tiroideo (CT) y en algunos síndromes tiene valor muy limitado en el diagnóstico precoz, con excepción del carcinoma medular de tiroides (CMT). Los factores de pronóstico adverso son: estadio avanzado, extensión, tamaño, edad al diagnóstico, tipo histológico y sexo.

El tratamiento del CDT (carcinoma diferenciado de tiroides) consiste en:

- 1) cirugía: tiroidectomía total (TT) o casi total (TCT) con linfadenectomía central, siendo aceptable en casos seleccionados de muy bajo riesgo la hemitiroidectomía (HT) con istmectomía
- 2) ablación de remanentes tiroideos con I^{131} , debiendo individualizar la dosis dependiendo de las características del paciente y del tumor
- 3) tratamiento con L-tiroxina (LT4) a dosis supresoras de TSH según las características del paciente, estadio del tumor y evolución posterior.

La preocupación principal en la moderna cirugía del tiroides es la disminución en la morbilidad. La cirugía tiroidea está asociada con las complicaciones propias de toda cirugía y además con las inherentes a la lesión de estructuras adyacentes al tiroides. El conocimiento de las características anatómicas de todas las estructuras del cuello y su origen embriológico, ha facilitado el correcto tratamiento de ciertas enfermedades.

7.2.- ABORDAJE QUIRÚRGICO DEL TIROIDES Y SU SEGUIMIENTO

Un abordaje metódico de la glándula tiroidea dará como resultado una morbilidad mínima. Una exposición adecuada es esencial y comienza por colocar al paciente correctamente en la mesa quirúrgica, apoyando las escápulas sobre una almohada flexible especialmente preparada y el cuello en extensión no forzada. La incisión se realiza lo más inferiormente posible, con hemostasia cuidadosa hasta abordar la celda tiroidea mediante separación de la musculatura pretiroidea, que excepcionalmente se secciona. Comenzar con la movilización medial y lateral del polo superior, prestando especial cuidado en no dañar el nervio laríngeo superior, prosiguiendo la disección próxima a la cápsula para preservar la glándula paratiroides superior. En la movilización medial de la glándula prestar especial cuidado en no seccionar ninguna estructura hasta estar seguro en la identificación del trayecto del nervio laríngeo recurrente. Una vez identificada la entrada del nervio en la tráquea y la localización de la glándula paratiroides inferior, proceder a la medialización del lóbulo, extirpando la pirámide y todo el istmo como “mínimo” gesto quirúrgico. En casos de lobectomía con istmectomía, el lóbulo contralateral es suturado con material reabsorbible. Generalmente dejamos un drenaje en la celda tiroidea operada y se cierra la musculatura pretiroidea para evitar adherencias de la dermis a la tráquea.

El daño del nervio laríngeo recurrente puede disminuirse con el estudio de sus relaciones anatómicas y con un esfuerzo en su identificación rutinaria en la intervención quirúrgica. El daño del nervio laríngeo superior es igualmente importante para evitar cambios en el timbre de la voz y en la capacidad de proyectar la voz incrementando el volumen. Las anomalías en el desarrollo del sistema arterial pueden dar como resultado a un nervio laríngeo no recurrente que le sitúe en un mayor riesgo de daño durante la cirugía.

Se debe prestar especial atención en la disminución de la morbilidad derivada de las disecciones ganglionares del cuello, referente a la preservación

de la sensibilidad del cuello, que puede conseguirse siguiendo una serie de principios quirúrgicos. No obstante, la preservación completa de toda la sensibilidad del cuello generalmente no es posible. Se pueden conservar las ramas ventrales del plexo sensitivo cervical (C2, C3 y C4) siempre que no exista una afectación ganglionar masiva o haya invasión extracapsular adyacente a dichas terminaciones.

Las ramas nerviosas del occipital menor (C2) y del auricular mayor (C3,C4), ascienden superficialmente al músculo esternocleidomastoideo e inervan sensitivamente el pabellón auricular, la piel retroauricular y la adyacente a la glándula parótida hasta unos 4 cm. anteriores al pabellón auricular. Pueden existir comunicaciones con las ramas del facial y del nervio vago. El nervio cutáneo cervical transverso (C2, C3), también se identifica en el borde posterior del esternocleidomastoideo, dirigiéndose anteriormente hacia la vena yugular externa e inervando la piel anterosuperior del cuello. Las ramas del nervio supraclavicular (C2, C3, C4) descienden hacia el platismo dividiéndose en tres ramas para inervar la región inferior del cuello y tórax superior, 3-4 cm por debajo de la clavícula. El nervio cutáneo cervical transverso es invariablemente sacrificado para poder desarrollar correctamente el colgajo dermograso anterior; la pérdida de sensibilidad en este último caso puede recuperarse con la reinervación de ramas contralaterales.

La completa preservación de la inervación sensitiva del cuello tras DM no es posible, pero en algunos casos seleccionados existe seguridad y ventajas funcionales de la conservación de las ramas sensitivas C2-C3-C4 durante la disección funcional del cuello, sin que esta variación técnica aumente la recurrencia locorregional ni afecte a la supervivencia.

Otras complicaciones como hemorragia, obstrucción de la vía aérea o crisis tirotóxica también pueden ocurrir. Esta última complicación puede evitarse preparando a los pacientes hipertiroideos antes de la cirugía con medicación antitiroidea.

El seguimiento del paciente debe ser de por vida, ya que las recidivas pueden aparecer años e incluso décadas después de la tiroidectomía. La respuesta a las cuestiones fundamentales (tipo de cirugía, indicación de ablación con I^{131} , dosis de I^{131} , nivel de supresión de la TSH con L-T4 y periodicidad del seguimiento), depende de: las características del paciente, las características del tumor y la experiencia del cirujano.

Las herramientas para el seguimiento a largo plazo más importantes son la determinación periódica de los niveles de tiroglobulina y la ecografía cervical de alta resolución, pudiendo ser necesarios la PAAF, y otros como el TAC, el TAC-PET o gammagrafía ósea cuando existe sospecha de recidiva o metástasis.

La tiroglobulina sérica (TG) es el marcador tumoral específico de recurrencia o persistencia del tumor, sólo los casos con TT completada con I^{131} y anticuerpos anti TG negativos. La introducción de TSH humana recombinante (rhTSH) ha supuesto un gran avance en el seguimiento del carcinoma diferenciado de tiroides (CDT) ya que aumenta la sensibilidad diagnóstica de la TG, simplifica el seguimiento y mejora la calidad de vida del paciente, ya que evita la necesidad de retirar el tratamiento con LT4.

El sistema TNM predice el riesgo de mortalidad, pero no de recurrencia por lo que se aconseja disponer de un sistema clínico-patológico postquirúrgico complementario para evaluar el riesgo de recidiva y planear el tratamiento (con I^{131} y supresión de TSH) y el seguimiento de forma individualizada. La ATA (Asociación Americana del Tiroides) en sus guías clínicas revisadas de 2009 propone el siguiente en 3 niveles:

Bajo riesgo de recidiva: si presentan las siguientes características:

1. Ausencia de metástasis locales o a distancia.
2. Resección completa del tumor macroscópico.
3. Ausencia de invasión de estructuras locorregionales o vasculares
4. Histología tumoral no agresiva

5. Ausencia de captación de I-131 fuera del lecho tiroideo en el primer rastreo corporal realizado postratamiento ablativo.

Riesgo intermedio de recidiva:

1. Invasión microscópica de tejidos blandos peritiroideos tras la primera cirugía.
2. Histología agresiva (tall-cell, insular, de células columnares,...) o invasión vascular.
3. Metástasis ganglionares cervicales.
4. Captación positiva de I-131 fuera del lecho tiroideo en el primer rastreo corporal tras tratamiento ablativo.

Riesgo alto de recidiva:

1. Invasión tumoral macroscópica.
2. Resección incompleta del tumor.
3. Metástasis a distancia
4. Tiroglobulina desproporcionadamente alta en relación a la habitual en el rastreo postratamiento ablativo con I-131.

El manejo del CDT requiere un abordaje multidisciplinario desde su diagnóstico e involucra a endocrinólogos, radiólogos, cirujanos, anatomopatólogos y médicos especialistas de Medicina Nuclear.

7.3.- LA DISECCIÓN GANGLIONAR DE CUELLO.

7.3.1. Introducción

Las vías de diseminación ganglionar de los tumores escamosos de cuello y del cáncer diferenciado de tiroides, presentan particularidades importantes que hacen que las modalidades terapéuticas de disección ganglionar sean

diferentes y, por tanto, las indicaciones también se adaptan al órgano implicado en la diseminación metastásica.

La diseminación metastásica del carcinoma diferenciado de tiroides y del carcinoma escamoso del tracto aerodigestivo tienen unos patrones predecibles. Debido a estos factores de conducta predecibles en la diseminación metastásica, es posible realizar modificaciones en la técnica quirúrgica. Sin embargo, existen actualmente diferentes puntos de vista en las indicaciones terapéuticas que se complican con el empleo de clasificaciones distintas en el estadiaje tumoral y en los análisis uni y multivariantes, que pueden hacer compleja la elección y comprensión del método quirúrgico idóneo. El empleo de una misma clasificación y una misma metodología quirúrgica haría que se pueda estandarizar el tratamiento para poder comprender mejor la conducta biológica de estos tumores. La diferencia en el tratamiento médico y quirúrgico de los tumores diferenciados de tiroides y del carcinoma escamoso del tracto aerodigestivo explica que se puedan diferenciar ambos tipos de disección ganglionar para una mejor comprensión del tema.

La utilización de una metodología de diagnóstico y tratamiento homogénea, empleando una terminología fácilmente comprensible, facilitaría en el futuro la difusión de diferentes pautas de tratamiento.

7.3.2. Recuerdo Anatómico de los espacios ganglionares del cuello.

Teniendo como base la anatomía quirúrgica y el desarrollo embriológico del sistema linfático cervicomediastínico (Fisco, 1964) y la descrita en detalle por Dralle (Dralle, 2005), los compartimentos linfáticos del cuello se pueden detallar de la siguiente manera (Fig.16):

-Compartimento 1: Compartimento central del cuello, derecho (1a) e izquierdo (1b) desde el plano traqueal y que se extiende hasta la vaina carotídea y desde el hueso hioides hasta el tronco venoso braquicefálico, incluyendo los ganglios submandibulares.

-Compartimento 2 y 3: Ganglios cervicolaterales derechos (2) e izquierdos (3) situados entre la vaina carotídea y el músculo trapecio. Abarca desde la vena subclavia hasta el plano del nervio hipogloso, anteroposteriormente, y entre los fascículos del plexo cervical.

-Compartimento 4: Ganglios mediastínicos a ambos lados de la tráquea, derechos (4a) e izquierdos (4b), desde el tronco venoso braquicefálico hasta la bifurcación aórtica dentro del mediastino anterior y posterior.

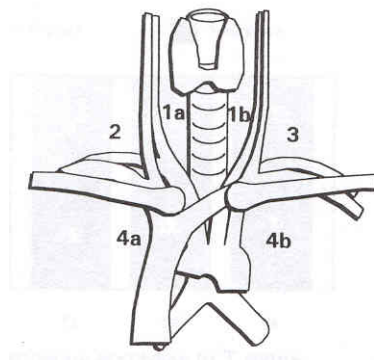


Fig.16. Compartimentos linfáticos del cuello

Esta clasificación se puede correlacionar con la descripción anatómica de los triángulos del cuello descritos en la literatura francesa por Y.Guerrier (Guerrier Y, 2005) (Fig.17):

-Triángulo anterolateral (A): submaxilar (1) y subdigástrico(2). Correspondería al Compartimento 1.

-Triángulo posterolateral (B): triángulo omo-trapecio (3) y triángulo omo-clavicular (4). Correspondería al plano más inferior del compartimiento 2.

-Triángulo interdigástrico (C).

-Triángulo subhiodeo (D).

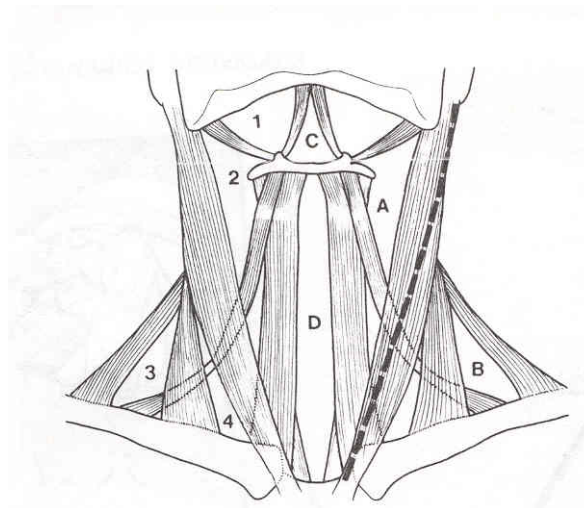


Fig.17. Descripción anatómica de los triángulos del cuello

Otras clasificaciones útiles de los espacios ganglionares del cuello son:

1. Clasificación del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (Fig.18):

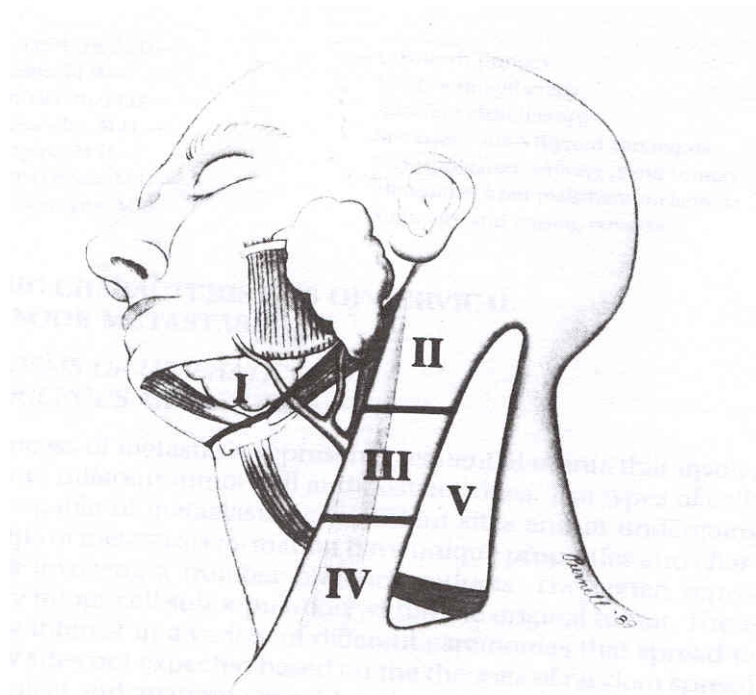
Nivel I: Triángulo submandibular.

Niveles II, III y IV: Tercios superior, medio e inferior de la cadena ganglionar de la vena yugular interna.

Nivel V: Triángulo posterior, que afecta a las cadenas ganglionares adyacentes al nervio espinal y cadena cervical transversa.

Nivel VI: Ganglios del surco traqueoesofágico.

Nivel VII: Ganglios del mediastino superior.



**Fig.18. Clasificación del Memorial Sloan-Kettering
Cancer Center**

Clasificación del M.D.Anderson Hospital (Houston).

Añade ligeras modificaciones a la clasificación anterior:

Nivel I: Dividido en IA (Ganglios submentonianos) y IB (Ganglios submandibulares)

Nivel II: Dividido en IIA (Ganglios subdigástricos) y IIB (ganglios yugulodigástricos en la base del cráneo.

Nivel III: Sin modificaciones

Nivel IV: Dividido en IVA (ganglios yugulares inferiores) y IVB (Ganglios supraclaviculares

Nivel V: Sin modificaciones.

Estas clasificaciones permiten establecer un lenguaje común entre diferentes equipos quirúrgicos y patólogos, y ayudan a comparar datos entre

diferentes hospitales que describen sus resultados en los tratamientos quirúrgicos.

7.4.- CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIROIDES Y METÁSTASIS GANGLIONARES

Una mejor comprensión en la fisiopatología de la enfermedad metastásica ganglionar del carcinoma diferenciado de tiroides, ha abierto nuevas fronteras en el manejo quirúrgico de pacientes con carcinoma metastático en los ganglios cervicales del cuello.

Las metástasis ganglionares cervicales en pacientes con cáncer papilar de tiroides pueden ser clínicamente evidentes o encontrarse microscópicamente en alrededor del 60-80 %. No obstante, su impacto pronóstico en la supervivencia es controvertido. Por el contrario, menos del 10% de pacientes con carcinoma folicular desarrollan metástasis ganglionares (Emerick, 1993).

Los factores de riesgo de desarrollar metástasis ganglionares cervicales en el carcinoma diferenciado de tiroides son: edad, tipo histológico (papilar versus folicular) y grado de extensión del tumor primario (Mc Conahey, 1986).

Los pacientes con menos de 40 años presentan casi un 50% de metástasis ganglionares en el momento de la presentación clínica y, por el contrario, los pacientes mayores de dicha edad sólo el 35% (Mazzaferri EL, 2007). El mayor riesgo para el desarrollo de posteriores metástasis ganglionares es la edad menor de 20 años o mayor de 70 años, presencia de metástasis ganglionares al inicio de la enfermedad y tumores de alto grado (Mazzaferri EL, 2007). (Tabla 9).

ALTO RIESGO	RIESGO MEDIO	RIESGO NO SIGNIFICATIVO
Edad <20 ó >70	Tumor no encapsulado	Sexo
Metastásis ganglionar al inicio Tto	Irradiación cuello	Tamaño tumoral
Invasión extratiroidea	Ausencia Enfermedad Graves	Nºfocos tumorales
Tumor alto grado		Tiroiditis Hashimoto
Invasión vasos sanguíneos		Formación foliculos

Tabla 9. Factores de riesgo del carcinoma diferenciado de tiroides.

Las metástasis ganglionares al inicio de la presentación clínica incrementan el riesgo de recurrencia local de la enfermedad, pero tienen poco impacto en la supervivencia global. Las metástasis del carcinoma papilar en los ganglios linfáticos cervicales raramente afectan la esperanza de vida de los pacientes. La afectación ganglionar del compartimiento central del cuello es de gran importancia, por lo que estos ganglios deberán ser disecados completamente para evitar recurrencias en dicho compartimiento. Si los ganglios no están afectados en el momento de la cirugía, generalmente no se procede a su disección, basándose en que la disección profiláctica no influye en la supervivencia comparado con los pacientes en los que sí se realizaba dicha disección ganglionar y que solamente el 20 % de pacientes (de algunas series) desarrollaban metástasis subsiguientes y éstos pacientes todavía podían rescatarse por disección de cuello electiva (Block, 1971).

Otros autores como Ferrero.E e Hidalgo.M, opinan que, al ser el compartimiento central del cuello la primera estación ganglionar de drenaje linfático tiroideo, debería realizarse un vaciamiento cervical ganglionar de dicho compartimiento y de la región paratraqueal-recurrencial del lado donde asienta el tumor primario, medialmente a la vaina carotídea (cadena ganglionar

recurrencial a lo largo del surco traqueoesofágico), incluyendo la disección del ganglio delfiano localizado en la membrana cricotiroidea. Sería necesario eliminar todo el tejido linfograso, evitando la extirpación de ganglios aislados (Berry-picking). Especial cuidado se debe tener en la preservación de la paratiroides inferior y en no dañar el nervio laríngeo recurrente en la disección central y peritraqueal respectivamente.

Las metástasis en los ganglios laterales del cuello raramente se presentan si no hay afectación ganglionar del compartimento central del cuello. La palpación preoperatoria de metástasis ganglionares laterocervicales o el diagnóstico intraoperatorio de las mismas, obliga a la realización de un vaciamiento ganglionar radical, generalmente “modificado” de cuello (disección terapéutica); raramente será necesario realizar un vaciamiento ganglionar radical. La extirpación selectiva y aislada de las metástasis ganglionares palpables latero-cervicales (berry-picking), no parece indicada en ningún caso ya que lo habitual es que ganglios más pequeños también estén afectados, aumentando la frecuencia de enfermedad recurrente loco-regional en el cuello (Noguchi, 1987). La disección profiláctica de los ganglios laterocervicales, esto es, la disección de ganglios no palpables, no es recomendable.

La disección contralateral de cuello no se recomienda, excepto en los casos de pacientes con extensa enfermedad bilateral (<10%). Recientemente Ohshima, basándose en pacientes tratados quirúrgicamente en la Noguchi Thyroid Clinic and Hospital Foundation de Beppu (Japón), recomienda la disección radical modificada bilateral en pacientes con carcinoma papilar que tienen factores de riesgo de recurrencia contralateral (varón, diámetro máximo > 2 cm., extensión tumoral hacia el istmo, adherencia o invasión extracapsular de tejidos vecinos y la presencia evidente de enfermedad metastásica unilateral en la cirugía inicial), basándose en que previene una segunda operación y mejora la supervivencia. Se ha especulado que las posibles metástasis ganglionares contralaterales de pequeño tamaño, después de la extirpación del tumor primitivo, tienden a regresar o permanecen estado latente subclínico. Además, en los pacientes tratados por el grupo de Noguchi no se empleó

tratamiento postoperatorio con yodo radioactivo y es posible que este hecho sea uno de los factores posibles que conducen a conclusiones diferentes con respecto a las referidas por otros muchos cirujanos. En muchos otros hospitales, estos pacientes identificados como de alto riesgo para desarrollar metástasis contralaterales habrían recibido tratamiento con yodo radiactivo. En este sentido el yodo radiactivo es el tratamiento preferido ya que trata la enfermedad local y las posibles metástasis a distancia y, por tanto, la disección radical modificada bilateral no estaría justificada debido a su potencial morbilidad.

La disección suprahiodea raramente es necesaria debido a que las metástasis ocurren en el 1% de los pacientes. Los ganglios del mediastino superior se palpan afectados por tumor en alrededor del 5% de los pacientes y deberán extirparse a través de la incisión cervical y, si esto no es posible, mediante una esternotomía parcial hasta el nivel del tercer espacio intercostal.

7.5.- DISECCIÓN FUNCIONAL DE CUELLO EN EL CÁNCER DIFERENCIADO DE TIROIDES

7.5.1. Disección del compartimiento central.

El vaciamiento del compartimiento central debe ser rutinario en cualquier paciente con cáncer de tiroides.

Por debajo del hueso hioides debemos mostrar especial atención en la presencia del ganglio delfiano, próximo al lóbulo piramidal y que puede simular un quiste tirogloso.

Lateralmente el vaciamiento, generalmente ipsilateral al tumor tiroideo, incluye la cadena ganglionar del recurrente laríngeo inferior siguiendo el surco traqueoesofágico. Deberán extremarse las precauciones para no lesionar al nervio laríngeo inferior y a la glándula paratiroides inferior.

En casos de lesión de la glándula paratiroides inferior se puede proceder al autotrasplante de la misma, previa comprobación en biopsia por congelación de que no se trataba de una adenopatía metastásica. En alguna ocasión dicha glándula se aloja en el tejido linfograso peritímico y no es posible su conservación, al ser su diagnóstico histopatológico en el estudio de la disección del compartimento central.

7.5.2. Disección funcional.

En la cirugía del cáncer de tiroides raramente es necesario realizar un vaciamiento radical de cuello. Generalmente mediante un vaciamiento “funcional” que identifica y preserva el músculo esternocleidomastoideo, vena yugular interna, nervio espinal, arteria cervical transversa, conducto torácico, plexo braquial, plexo simpático y nervio frénico. El vaciamiento radical sólo se realiza en casos de invasión de estas estructuras por adenopatías metastásicas de gran volumen que presentaban rotura capsular y/o infiltración de tejidos por el tumor (Ferrero E, 1995). Excepcionalmente, es necesario abordar el compartimento mediastínico por una vía transesternal.

Generalmente se realiza una cervicotomía transversa de Kocher, prolongando la incisión lateralmente en sentido ascendente, en dirección a la apófisis mastoides (Incisión en L de Paul Andre) (figura 19).

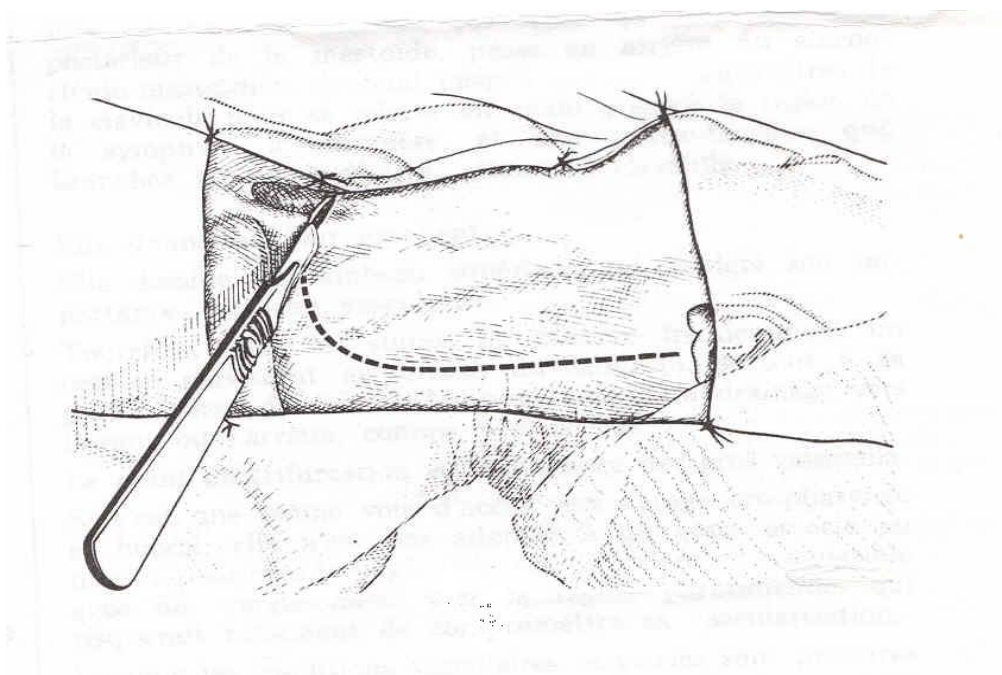


Figura 19. Incisión en “L” de Paul Ander.

Desde 1987, la disección del compartimento central del cuello es parte integrante del procedimiento quirúrgico en casi todos los pacientes con cáncer papilar de tiroides. La disección funcional lateral de los compartimentos II, III, IV y V solamente se realiza en casos de afectación macroscópica de los ganglios o cuando hay datos de afectación ganglionar facilitados por la TAC cervical; es decir, sólo se realiza con intención “terapéutica” y nunca de manera “profiláctica”. La mayoría de la afectación ganglionar se localiza en los compartimentos II, III y IV, teniendo muy pocos pacientes con metástasis evidentes en los niveles I, V y VI.

En los pacientes con invasión del tejido muscular adyacente al tumor, se puede realizar la exéresis “en bloque”, junto al tiroides tumoral, de la musculatura pretiroidea afectada. La extirpación del esternocleidomastoideo raramente es necesaria. En casos de difícil abordaje a los compartimentos II, III, IV y V, la sección en su extremo clavicular para una mejor exposición del espacio yugulocarotídeo, triángulo posterior y área de los grandes vasos en la base del cuello. Si los ganglios metastásicos están adheridos a la vena yugular interna, se procede a su extirpación en bloque con las adenopatías tumorales.

La morbilidad derivada de las disecciones ganglionares del cuello, referente a la preservación de la sensibilidad del cuello, puede disminuirse siguiendo una serie de principios quirúrgicos. No obstante, la preservación completa de toda la sensibilidad del cuello generalmente no es posible. Es posible conservar las ramas ventrales del plexo sensitivo cervical (C2, C3 y C4) siempre que no exista una afectación ganglionar masiva o con invasión extracapsular. Se identifican estos nervios cerca de su origen, en el punto medio de su salida en el borde posterior del músculo esternocleidomastoideo.

Las ramas nerviosas del occipital menor (C2) y del auricular mayor (C3, C4), ascienden superficialmente al músculo esternocleidomastoideo e inervan sensitivamente el pabellón auricular, la piel retroauricular y la adyacente a la glándula parótida hasta unos 4 cm. anteriores al pabellón auricular. Pueden existir comunicaciones con las ramas del facial y del nervio vago. El nervio cutáneo cervical transverso (C2, C3), también se identifica en el borde posterior del esternocleidomastoideo, dirigiéndose anteriormente hacia la vena yugular externa e inervando la piel anterosuperior del cuello. Las ramas del nervio supraclavicular (C2, C3, C4), descienden hacia el platisma dividiéndose en tres ramas para inervar la región inferior del cuello y tórax superior, 3-4 cm. por debajo de la clavícula.

Durante el desarrollo del colgajo posterior, se debe identificar el nervio espinal que generalmente se encuentra superior a la salida de las ramas sensitivas anteriormente mencionadas. Este nervio es un excelente marcador para identificar el plexo sensitivo cervical. Siempre que es posible se debe conservar el nervio auricular mayor y el occipital menor. Sin embargo, el nervio cutáneo cervical transverso es invariablemente sacrificado para poder desarrollar correctamente el colgajo dermograso anterior; la pérdida de sensibilidad en este último caso puede recuperarse con la reinervación de ramas contralaterales.

Estas variaciones técnicas no aumentan las recurrencias locales. La aplicación de estos principios en pacientes con cáncer de mama, en las que se han conservado las ramas del nervio intercostobraquial, no aumenta la

recurrencia locoregional axilar y tiene unos importantes beneficios en la conservación de la sensibilidad del brazo.

En el lado izquierdo, al comprimir el tejido linfograso alrededor de la unión entre la vena yugular interna y el confluente subclavio se puede observar como se dilata el conducto torácico, lo que puede permitir su localización y preservación. Si se observan fístulas deberán ser cerradas. Este conducto lo hemos visto ascender en el cuello hasta 3 o 4 cm antes de su punto de entrada en las venas (figura 20). Este conducto puede ser difícil de encontrar y ser fácilmente dañado en el transcurso de la disección; mientras se realiza la disección en otra área, se puede dejar colocado temporalmente un pequeño clamp en el tejido areolar donde se localiza la entrada del conducto torácico en las venas de drenaje, apareciendo en unos pocos minutos una marcada dilatación del mismo y de las numerosas ramas cervicales que confluyen en él. Estas ramas pueden ser ligadas y seccionadas para evitar posibles fístulas en el postoperatorio.

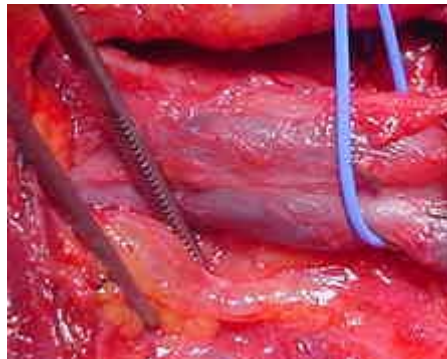


Figura 20. La pinza señala el conducto torácico

La extensión de la tiroidectomía puede estar guiada por la infiltración de tejidos adyacentes. Ocasionalmente, el tumor puede infiltrar o ser muy adherente con la tráquea adyacente. Suelen ser tumores pobremente diferenciados y la invasión traqueal puede ser por invasión directa o por crecimiento a partir de una metástasis ganglionar (Machens, 2001). Si no existen otras contraindicaciones, deben fijarse los márgenes de infiltración y extirpar la pared traqueal alrededor de dichos márgenes. Si es posible, es

aconsejable el cierre primario o la reconstrucción con colgajo muscular del músculo ECM, pectoral mayor o periostio clavicular (Guillenwater, 1999); en otras ocasiones se deberá realizar una traqueotomía en la apertura circular o esferoidal traqueal, manteniendo el tubo traqueal durante varias semanas. Generalmente, la apertura traqueal se cierra espontáneamente.

JUSTIFICACIÓN e HIPÓTESIS DE TRABAJO

La punción aspiración con aguja fina (PAAF) de nódulos tiroideos ha ganado una amplia aceptación como un valioso método para distinguir nódulos neoplásicos o susceptibles de malignidad y la identificación de los pacientes que pueden ser candidatos para cirugía como factor independiente de otras características clínicas.

La clasificación etiopatogénica de las lesiones tiroideas (benignas y malignas) con especial énfasis al etiquetado del carácter neoplásico o benigno de las lesiones nodulares, adenomatosas o multifocales del tiroides que producen bocio, así como el descubrimiento de las bases moleculares de las mismas podrá ayudar a mejorar las indicaciones de los distintos tipos de cirugía en cada paciente.

En este proyecto se ha seleccionado una variedad de genes relacionados con la patología tiroidea. Empleando marcadores intragénicos en estos genes y el análisis multilocus se pretende identificar patrones genéticos específicos de cada patología en estudio. La consecución, aún parcial, en la identificación de patrones predictivos, aplicables al diagnóstico diferencial de la patología tiroidea, podría revolucionar el manejo clínico de los pacientes mediante la racionalización y priorización de tratamientos más o menos agresivos.

Formalmente existen pocos antecedentes en la aplicación de esta estrategia a las patologías tiroideas, no obstante, el empleo de marcadores de un único locus analizando pérdidas de heterocigosidad en el oncogen VHL parecen predecir la malignidad de los tumores foliculares de tiroides y aún el riesgo de muerte de los pacientes (Hunt y cols., 2003). Igualmente, existen haplotipos concretos del oncogen RET que se asocian a la aparición del cáncer medular o papilar de tiroides (Ruiz y cols., 2001, Lesueur y cols 2002). Más recientemente la existencia de poligenes relacionados con la enfermedad de Graves ha sido puesta de manifiesto (Ueda y cols., 2003).

La integración de factores constitucionales (en su mayoría genéticos) y los factores exógenos que contribuyen a cada patología es el objetivo final de los estudios de asociación genética que en la actualidad se practican. La información derivada de estos proyectos, una vez integrada, será la base del conocimiento de lo que hoy denominamos **medicina predictiva** que permitirá el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas basadas en una clasificación genética de los pacientes.

La mayoría de las enfermedades tiroideas tienen un carácter multifactorial y es necesaria la convergencia de una serie de factores genéticos y ambientales interactuando de forma conjunta para que se produzca la patología. Desafortunadamente, la mayoría de estos factores causales son desconocidos y aún es necesario un gran esfuerzo en lo referente a epidemiología clínica y molecular para identificarlos. El carácter multifactorial de la etiología se ha establecido en las patologías más comunes de la glándula tiroides como el bocio nodular simple (Hegedus y cols 2003) y los casos esporádicos de carcinoma papilar, folicular, medular o anaplásico de tiroides (Ruiz y cols. 2001; Gim y cols 2002) o la enfermedad de Graves, de carácter autoinmune, aunque de etiología multifactorial (Ueda y cols. 2003).

Con la tecnología actual, desde un punto de vista genético, y una buena clasificación de los pacientes intervenidos por cualquier patología tiroidea podemos comenzar a identificar cuáles son los factores genéticos que condicionan la aparición de cada una de las patologías habitualmente intervenidas quirúrgicamente y, de esta forma, con la información obtenida de casos retrospectivos, podremos predecir el grado de malignidad de las lesiones tiroideas de casos prospectivos, o el subtipo anatomopatológico que más probablemente padece el individuo en estudio e incluso el pronóstico a largo plazo de la lesión.

La genómica estructural y funcional humana son nuevos conceptos que engloban a todos los estudios genéticos encaminados a determinar variaciones genéticas interindividuales involucradas en la etiopatogenia de las

enfermedades. En la actualidad es posible, siempre que se disponga de la tecnología adecuada, efectuar una evaluación molecular de cualquier gen humano buscando nuevos polimorfismos (SNPs, VNTRs), efectuando con ellos estudios de asociación (casos y controles) o estudios de ligamiento genético en cohortes de pacientes adecuadas, así como el estudio de asociación causal de las mutaciones puntuales, los re-arreglos genéticos y las alteraciones de la expresión génica en los tejidos involucrados en las diferentes patologías en estudio. (Collins, 1999, 2001). La información derivada de estos proyectos, una vez integrada, será la base del conocimiento de lo que hoy denominamos “medicina predictiva” que permitirá el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas basadas en una clasificación genética de los pacientes.

Mediante empleo de marcadores polimórficos en genes candidatos es posible predecir el tipo de lesión más probable que padece un paciente con una lesión tiroidea. La investigación de paneles predictivos basados en la tecnología de ADN en pacientes previamente diagnosticados de las patologías tiroideas más comunes podría revolucionar el manejo prospectivo del bocio tiroideo, ayudando a la priorización de las intervenciones quirúrgicas de estos pacientes.

OBJETIVOS

En este trabajo los objetivos principales deben contemplarse desde dos vertientes diferentes:

1) Datos generales y terapéuticos:

- A) Valoración estadística de los pacientes incluidos en el estudio, pormenorizando los datos descriptivos (Edad, Sexo, Diagnóstico) en relación a trabajos similares ya publicados anteriormente, para saber si existe alguna diferencia demográfica en los pacientes incluidos en el estudio y que corresponden todos al Area Sanitaria de Madrid.
- B) Estudio de las diferentes técnicas quirúrgicas y su correlación con los resultados obtenidos.
- C) Valoración del estudio anatomopatológico y clasificación clínica de los estadios para tratar de llegar a una relación clínicopatológica que pueda tener valor pronóstico en el futuro.

2) Estudios Genéticos:

- A) Generar un banco de ADN de pacientes con patología tiroidea quirúrgica para efectuar estudios genéticos programados en un futuro.
- B) Minería de datos y selección de genes mediante clonaje posicional/DNA arrays o biochips: mediante rastreo bioinformática o genómico se seleccionan genes candidatos para su estudio.
- C) Identificación y puesta a punto de SNP (polimorfismos) intragénicos en loci candidatos seleccionados. Desarrollo y empleo de sistemas espectrofluorimétricos de detección genética de alta productividad.
- D) Ensayos de epidemiología molecular: estudios de casos-control, de asociación genética y correlación fenotipo-genotipo.
- E) Mecanismos moleculares del gen aislado.
- F) Secuenciación genómica en un grupo de pacientes con Carcinoma Papilar Tiroideo y su correlación clínico-patológica

- G) Establecer correlaciones fiables entre distintos genes y las enfermedades tiroideas intervenidas quirúrgicamente, mediante la búsqueda de diferencias entre los distintos alelos en el ADN y sus homónimos en el tejido tumoral.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. GENERALIDADES

Se realiza un estudio retrospectivo, sobre 109 casos consecutivos de carcinoma papilar y folicular que tras ese diagnóstico fueron tratados quirúrgicamente.

Tras esta primera fase, se enviaron los datos y las muestras obtenidas al Departamento de Genómica Estructural de NeoCodex, en Sevilla (España), empresa dedicada al estudio de la genética y genómica, donde se realizó la segunda parte del proyecto y se obtuvieron los resultados genéticos de las muestras.

Este proyecto de investigación ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario 12 de Octubre que ha dado su conformidad para la utilización de los tejidos obtenidos de las diferentes piezas quirúrgicas. Cada paciente firmó un consentimiento informado en el que aceptaba el uso de éstos en la investigación médica antes de ser intervenido quirúrgicamente.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

En el Servicio de Cirugía General y Digestiva “B” del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid (España) (UCM), fueron diagnosticados de Cáncer Diferenciado de Tiroides e intervenidos quirúrgicamente 130 pacientes según protocolo clínico previamente establecido en el periodo comprendido entre Enero de 1994 y Enero de 2009.

Fueron excluidos los pacientes sin estudio citológico por PAAF preoperatorio por lo cual el trabajo fue realizado en 109 pacientes. Los datos sobre los hallazgos histopatológicos, diferenciación tumoral, procedimientos quirúrgicos y los resultados se recopilaron a partir de los expedientes de estos

pacientes en una base de datos informatizada y creada originalmente para el estudio y seguimiento de estos pacientes; y todos ellos incluidos en los resultados de este trabajo.

El estudio genético se realizó en 41 pacientes con Carcinoma Papilar de Tiroides, cuya muestra se obtuvo de los 109 pacientes con Carcinoma Papilar de Tiroides que estaban incluidos en el Protocolo del Servicio de Cirugía “B” en el Hospital 12 de Octubre de Madrid y que conforma la primera parte de este estudio. Sólo fue posible realizar el estudio genético en 41 pacientes debido a la fragilidad de las muestras del laboratorio y otros inconvenientes, como insuficiente material para el estudio genético, rotura de la muestra durante su manejo y alto coste económico.

El tejido del carcinoma de tiroides fue obtenido, al igual que su contralateral sano, mediante biopsia en el mismo individuo de los 41 pacientes que han sido objeto del estudio. Otros 178 individuos de población general caucásica mediterránea fueron reclutados para realizar la comparación de la frecuencia alélica.

En todos los pacientes, la PAAF se realizó sistemáticamente y de manera rutinaria en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre (UCM) por un experto citopatólogo mediante método convencional/método manual o realizado bajo guía ecográfica por un radiólogo.

La información de la PAAF no estuvo disponible en 21 casos examinados y se excluyeron de este estudio. En todos los casos, la PAAF se realizó mediante una aguja de calibre 25 conectada a una jeringa de 10 ml. En promedio, se realizaron dos pasadas sobre cada uno de los nódulos, lo que resulta en dos frotis secados al aire y dos frotis fijados en alcohol. Los frotis secados al aire fueron teñidos con el tinte Diff-Quik (Harleco, Gibbstown, NJ) para la evaluación sobre el terreno. Los frotis fijados en alcohol fueron teñidos mediante una técnica de Papanicolaou modificada. El resto del material se enjuaga con la preparación de Normosolt (Abbott Laboratories, Chicago, IL) para bloque celular y filtro Millipore (Millipore, Bedford, MA).

Los diferentes tipos de resultados en la PAAF fueron diagnosticados como “coloide benigno”, “atipia celular”, “proliferación folicular” y “sospechosa de malignidad” de acuerdo a los resultados publicados anteriormente. Todos los pacientes fueron seguidos prospectivamente. Los datos se obtuvieron del programa informático del Servicio de Cirugía General y Digestiva “B” y del Departamento del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre. Todos los pacientes, sin exclusión alguna, fueron sometidos a tratamiento quirúrgico. Los tumores fueron re-estadiados mediante la clasificación TNM 2007.

3. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

La extensión de la tiroidectomía se obtuvo del programa informático del Servicio de Cirugía General y Digestiva “B” del Hospital Universitario 12 de Octubre y que se introdujo en el registro con arreglo a las siguientes definiciones: **Hemitiroidectomía** comporta la extirpación de la totalidad del lóbulo tiroideo y también incluye la resección del istmo. **Tiroidectomía total** extracapsular es la extirpación de ambos lóbulos y el istmo, no dejando visible tejido tiroideo, mientras que en la **Tiroidectomía casi total** del tejido tiroideo se deja un pequeño remanente de tejido tiroideo (1-2mm) para evitar dañar el nervio laríngeo recurrente inferior y/o la vascularización de la glándula paratiroidea. En los casos que hubo que repetir la cirugía, que se realizó dentro de los 2 meses desde la operación inicial, éste se anotó como un único procedimiento quirúrgico. Toda la información sobre la cirugía de los ganglios linfáticos se registró y subdividió en niveles ganglionares según los informes histopatológicos y los compartimentos ganglionares del cuello.

La **dissección de cuello modificada** (o funcional) comprende la eliminación de todos los tejidos grasos y fibrosos incluyendo los ganglios linfáticos, pero conserva el músculo esternocleidomastoideo, la vena yugular interna, nervio vago, del nervio espinal accesorio y los nervios sensoriales, ya

sea de manera unilateral o bilateral. La **dissección radical del cuello** incluye la eliminación de las estructuras mencionadas. La **dissección central del cuello** incluye la extirpación de todos los ganglios linfáticos pretraqueales y adyacentes al tumor y del trayecto del nervio laríngeo recurrente inferior homolateral al lóbulo tiroideo tumoral.

En este estudio los pacientes fueron sometidos a:

1. tiroidectomía total o tiroidectomía casi total y la dissección central de los ganglios linfáticos (CLN) de manera profiláctica, cuando el diagnóstico de neoplasia maligna estaba comprobado histológicamente.
2. El resto de pacientes fueron sometidos a hemitiroidectomía con istmectomía cuando el paciente en el lóbulo contralateral, no mostraba patología en la ecografía preoperatoria.

La eliminación de toda la glándula tiroides se realizó en primer lugar, seguido por la dissección CLN. La extensión de la dissección del CLN fue hasta el hueso hioides cranealmente, la carótida lateralmente, y la vena innominada caudalmente.

Para los pacientes con estadio TNM I y II, la cirugía de los ganglios linfáticos se realizó sin procedimientos para seleccionar los ganglios, es decir, con “técnica monobloque” sin dissección selectiva individual de cada ganglio linfático. La linfadenectomía laterocervical funcional no se hizo con intención profiláctica sino sólo en presencia de afectación ganglionar comprobada histológicamente de manera pre o intraoperatoria.

4. ESTUDIO GENÉTICO

Tuvo lugar en diferentes etapas:

4.1.- EXTRACCIÓN DEL ADN

El método de extracción de ADN a partir de biopsias es un punto crítico para métodos genéticos y moleculares. Tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina es un método de rutina en los laboratorios en la actualidad y permite un almacenamiento fácil. El problema principal que presenta este tipo de muestra se debe a que es muy difícil eliminar completamente la parafina. Esta parafina actúa como inhibidor de reacciones enzimáticas, lo cual hace que el ADN obtenido sea de mala calidad y se degrade y fragmente fácilmente.

En este estudio, gracias al protocolo optimizado por el laboratorio de genética para este proceso de extracción de ADN, se han conseguido buenos resultados en la calidad y en la cantidad del 90% de las muestras.

El ADN genómico fue extraído de los tejidos tumorales y no tumorales.

1.- Las muestras de tejido han sido fijadas en formalina e incluidas en parafina. De cada tejido, se cortan en microtomo secciones de 2 μm de espesor. Se debe eliminar con el bisturí toda la parafina que se pueda y cortar el tejido en trozos lo más pequeño posible. Introducir el tejido en un tubo de 1.5 ml.

Entre un tejido y otro hay que limpiar la cuchilla y el microtomo con hipoclorito sódico, EtOH (etanol) 70% y secar con papel.

2. – Se añade 1 ml de Xileno, se agita 10 segundos y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga 5 minutos a máxima velocidad y se quita el sobrenadante con una pipeta con cuidado para no aspirar el *pellet*. Se repite el paso 2 hasta que no se observe parafina.

3. – Se añade 1 ml de Xileno y se homogeneiza. Entre tejidos se lava el homogeneizador con SDS y abundante agua para eliminar restos de tejido,

luego se sonica, y al final se introduce en un falcon con Xileno para poder eliminar restos de parafina y se seca con papel.

4.- Se centrifuga 5 minutos a máxima velocidad y se quita el sobrenadante.

5.- Se añade 1 ml de EtOH 100% a temperatura ambiente para lavar el *pellet*. Se agita 10 segundos y se centrifuga. Eliminar el sobrenadante. Repetir este paso con 1 ml de EtOH 95%. Hacer un lavado final repitiendo este proceso con 1 ml de EtOH 75%.

6.- Se elimina el sobrenadante y se centrifuga 10 segundos para recoger todo el residuo líquido.

7.- Se seca el *pellet* en estufa a 37°C, o bien a temperatura ambiente.

8.- Finalmente, los tejidos fueron depositados en “Tissue Lysis Buffer” y agitados durante la noche a 55°C y 120rpm

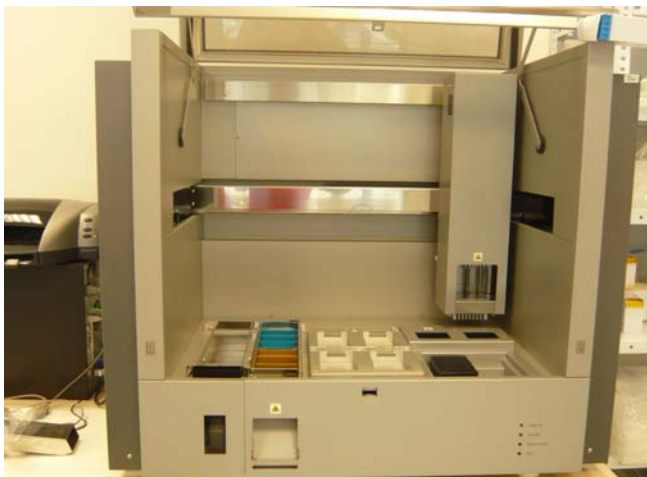


Figura 21. Máquina de Extracción de ADN.

9.- La extracción automatizada de ADN se realizó utilizando “Magna Pure LC DNA isolation Kit II, Tissue” y según las indicaciones del fabricante.

4.2.- FABRICACIÓN DE MICROARRAYS

La secuenciación de genomas y el lanzamiento de la tecnología de las matrices de ADN o biochips de ADN (DNA arrays) permite comprender más

rápidamente e íntegramente el funcionamiento de una célula viva. La ventaja de los chips de ADN es que la información de la actividad de miles de genes se puede conocer mediante una disposición matricial de copias de dichos genes en un espacio muy reducido. Se entenderá sobreexpresión de un gen cuando la intensidad de éste en la muestra problema sea 2 veces superior o más que la muestra control, y subexpresión cuando este valor sea 2 veces inferior o más a la muestra control.

Para la fabricación se diseñan oligonucleótidos específicos de cada gen y que tengan complementariedad con moléculas de cADN (secuencias exónicas). La selección de genes incluidos en el biochip se efectúa tras un intenso proceso de extracción de datos de las fuentes disponibles (datamining en genbank, pubmed, omim, genecard, locuslink, etc). En este estudio se seleccionaron genes localizados en aquellas regiones genómicas donde aparezcan pérdidas de heterocigosidad, identificadas mediante el empleo de microsatélites distribuidos a lo largo de todo el genoma. Estas regiones son sometidas a proceso de identificación de genes mediante herramientas bioinformáticas convencionales.

4.3.- AMPLIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO MEDIANTE PCR

La tecnología de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) permite una amplificación selectiva de una secuencia específica de ADN. Para ello es necesario conocer las secuencias flanqueantes a la región de interés. A partir de esta información, se construyen dos cebadores o *primers*: secuencias cortas de ADN (unas 15.30 bases) que son complementarias de las cadenas opuestas a cada extremo de la región que se quiere amplificar. Para que la reacción se realice, es necesario la presencia de los precursores del ADN (desoxinucleótidos trifosfato, dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la actuación de una ADN polimerasa. Las cadenas de ADN que van siendo sintetizadas, se utilizan,

a su vez, como moldes en los siguientes ciclos. El número de copias crece exponencialmente alcanzándose, tras unos 30 ciclos, un número de copias de la región de interés de 10/6 o superior.

La **reacción de PCR** se desarrolla generalmente en tres pasos:

- **Desnaturalización**. Separación de las dos cadenas de ADN. Generalmente se realiza a 95°C para el ADN genómico humano.
- **Hibridación o annealing**. Unión de los cebadores al molde. La temperatura a la que se realiza generalmente oscila entre los 50 y los 70°C, dependiendo de la temperatura de fusión (T_m) del dúplex que forman. Usualmente la temperatura de hibridación (T_a) es unos 5°C inferior a la de fusión.
- **Síntesis de ADN o extensión**. Normalmente se realiza a 72°C.

Debido a las altas temperaturas que se alcanzan durante el proceso de desnaturalización, la ADN polimerasa ha de ser termoestable. La enzima más utilizada es la Taq polimerasa, enzima procedente de la bacteria *Thermus aquaticus*.

A continuación se describe una PCR tipo. Las concentraciones de los distintos reactivos pueden sufrir ligeras modificaciones dependiendo del fragmento concreto a amplificar y de la técnica empleada para su análisis.

1.- Reactivos utilizados en PCR

ADN molde (ADN genómico.....	5ng
Desoxinucleótidos trifosfato.....	125µM (total)
Cl ² Mg.....	1,5mM
Primers (cebadores).....	0.5µM (cada uno)
Taq polimerasa (5U/µL).....	2 unidades
H ₂ O csp.....	20µl

2.- Amplificación

Las condiciones de amplificación de cada uno de los fragmentos aislados por PCR son muy variables.

Di.....	Ciclo de Desnaturalización Inicial
TaD.....	Temperatura de Desnaturalización
TiD.....	Tiempo de Desnaturalización
TaH.....	Temperatura de Hibridación (“annealing”)
TiH.....	Tiempo de Hibridación (“annealing”)
TaE.....	Temperatura de Extensión
TiE.....	Tiempo de Extensión
N.....	Número de ciclos
Ef.....	Ciclo de Extensión final de la PCR

4.4.- SELECCIÓN DE MARCADORES

Se seleccionaron una serie de genes candidatos teniendo en cuenta la literatura publicada previamente y la novedad de diferentes estudios. El criterio de selección incluye su relación funcional o epidemiológica con el Carcinoma Papilar de Tiroides, atendiendo a las corrientes más novedosas de pensamiento.

Se han analizado nueve marcadores polimórficos o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) en tres genes diferentes: EMSY, CAPN5 Y PAK1 mapeados en la región 11q13-q14 y con una extensión aproximada de 1Mb. Para cada gen se escogen 3 marcadores polimórficos (heterocigosidad entre 37%-54%): rs4300410, rs2508760 y rs2251075 para EMSY; rs11237076, rs4259851 y rs4945146 para CAPN5; y rs2729762, rs2844336 y rs538670 para PAK1.

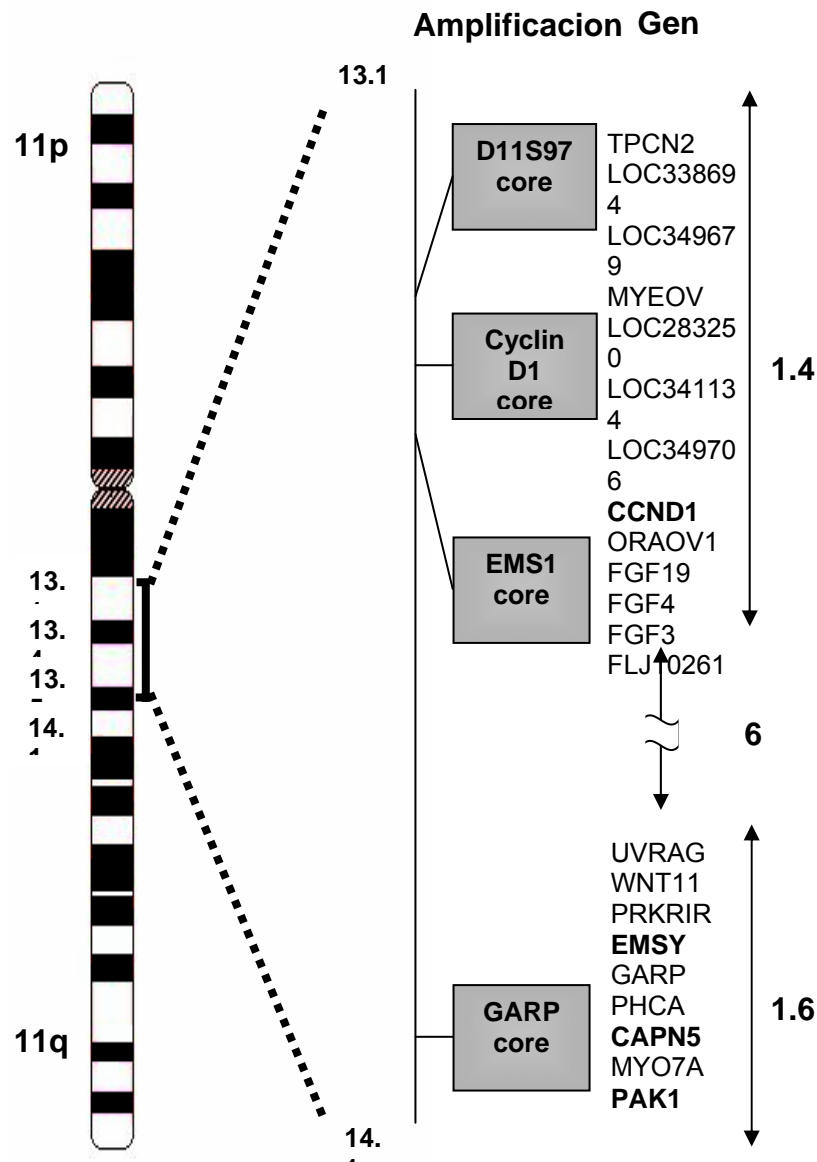


Figura 22. Representación gráfica de la zona genómica ampliada donde se encuentran los loci estudiados.

Genotipación mediante el sistema de Pirosecuenciación

La técnica de análisis genético más utilizada para este trabajo ha sido el sistema de Pirosecuenciación. Este método tiene muchas ventajas en relación a otros métodos utilizados en otros estudios genéticos, ya que es un método

muy sensible, fiable y seguro para realizar cuantificación alélica, y no precisa plataformas costosas, permitiendo utilizar como material de partida ADN de tejido parafinado de pacientes con cáncer.

El sistema de PIROSECUENCIACIÓNTM es un método de genotipación que permite la secuenciación en tiempo real de 96 muestras de ADN. Consiste en la detección de bioluminiscencia que se produce por la acción de la Luciferasa al incorporarse los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) a la cadena en extensión. La región de interés es amplificada previamente en un termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.) teniendo en cuenta en el diseño de los cebadores que el tamaño óptimo para su análisis mediante este sistema no debe superar 200 -300 pb. Además, es necesario que uno de los cebadores esté marcado en 5' con biotina. El mayor inconveniente de este proceso, es que requiere un oligonucleótido biotinilado para cada polimorfismo que se desee estudiar. Por esta razón, el laboratorio especialista en genética que ha colaborado en este estudio, ha diseñado un eficiente sistema de marcaje indirecto, que permite marcar prácticamente cualquier producto de PCR mediante un diseño particular de la pareja de cebadores, y el uso de una reacción son una correcta estequiometría entre estos dos y un tercer oligonucleótido universal biotinilado

La dispensación de reactivos y ADN en placa para su amplificación por PCR se ha realizado empleando el sistema automático Biomek® 2000 (Beckman CoulterTM, USA). Una vez finalizada la reacción de PCR, la placa que contiene los amplicones es incubada en agitación durante 10 min. con una mezcla que contiene 3 µl de sefarosa, 37 µl de tampón de inmovilización y 20 µl de agua por muestra.

Finalizada la incubación y ayudados por una bomba de vacío, se captura el amplificado mediante un cepillo especial que retiene el complejo biotina-sefarosa. A continuación se realiza un pase por etanol al 70%, seguido por una solución de desnaturalización y, finalmente, un tampón de lavado. Como resultado, sólo la cadena marcada con biotina permanece unida al cepillo.

Mediante la interrupción del suministro de vacío liberamos la cadena de ADN en una nueva microplaca de 96 pocillos que contiene, en cada uno, 2 μ l del cebador de secuenciación a una concentración 10 mM y 38 μ l de tampón de hibridación o unión del cebador. Esta placa se incuba durante 2 minutos a 80°C para posteriormente dejar enfriar a temperatura ambiente. Esta disminución gradual de la temperatura, permite la unión del cebador de secuenciación. La reacción de secuenciación

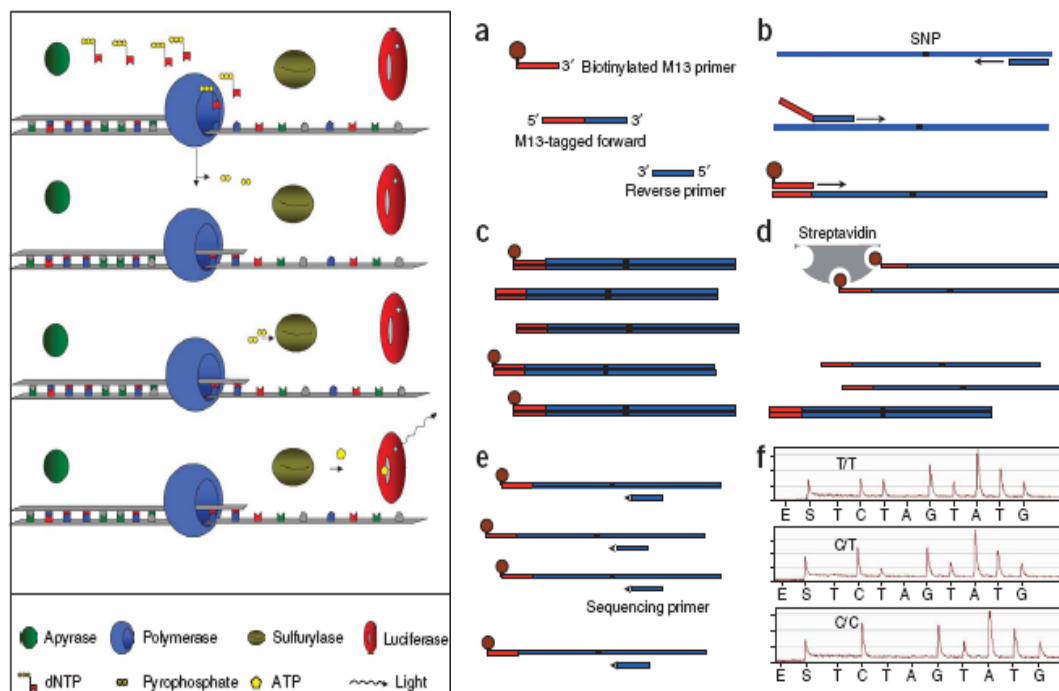


Figura 23. Bases moleculares de la reacción de Pirosecuenciación.

4.5.- GENOTIPO Y DESAJUSTE ALÉLICO: ANÁLISIS

El análisis molecular se realizó en 41 muestras de tejido de PTC y en su correspondiente contralateral sano, además de ser realizado en los 178 casos-control. Se utilizaron los 9 marcadores.

El genotipo se realizó mediante pirosecuenciación según el protocolo del fabricante. La pirosecuenciación se utilizó como método rápido y preciso para el genotipado y para cuantificar la frecuencia de alelos, ya que da una medida cuantitativa de las cantidades relativas de cada alelo.

El desajuste alélico se detectó cuando la intensidad de un alelo en el ADN del tumor se redujo o estaba ausente en comparación con el ADN normal. Los resultados de pérdida alélica son reproducibles en ensayos por triplicado para cada muestra. Un porcentaje relativamente pequeño (10%) de un determinado alelo podría detectarse de manera fiable.

5. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis con estadística descriptiva mediante una descripción general de las distintas variables del análisis, tales como los resultados histopatológicos, estadio TNM, el tratamiento postoperatorio y el tipo de cirugía. El resumen de la información de las variables tratadas se presenta, para aquellas que son cualitativas o no numéricas, mediante su distribución de frecuencia absoluta y porcentaje. Las variables numéricas o cuantitativas se describieron mediante sus medidas de tendencia central, media o mediana, acompañadas de dispersión, desviación estándar o rango intercuartílico. La descripción gráfica se realizó mediante box-plot, diagramas de barras y diagramas de sectores según la naturaleza de las variables empleadas.

El análisis de asociación utilizado para la estadística analítica consistió en un estudio de asociación entre variables cualitativas mediante el test de la Chi Cuadrado de Pearson o el test exact de Fisher, en el caso de que más de un 25% de los esperados fueran menores de 5. Se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, para estudiar la relación entre variables cualitativas y variables cuantitativas. Las comparaciones múltiples, dos a dos, fueron efectuadas corrigiendo el nivel de significación estadística.

Una vez finalizado el proceso de genotipación de las muestras y obtenidos los datos crudos, se inicia el análisis estadístico a nivel genético.

Es necesario conocer las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos analizados en la población en estudio. En una población, las proporciones relativas de los diferentes genotipos se mantienen constantes de una generación a otra, asegurando así a diversidad. Esto se conoce como equilibrio de Hardy-Weinberg. Para el análisis estadístico de distribución de genotipo, se utilizaron las pruebas de desviación de equilibrio de Hardy-Weinberg y los estudios de asociación de 2 puntos, todos provenientes de los test del instituto alemán para la genética humana. Para que esta ley se cumpla, son requisitos imprescindibles la panmixia (uniones al azar) y la ausencia de influencias externas, es decir, la ausencia de presión selectiva. Otros factores que pueden alterar el equilibrio de Hardy-Weinberg son la aparición de nuevas mutaciones, los movimientos migratorios o la derivación génica. La determinación del cumplimiento de este principio se usa comúnmente como control de calidad de la genotipación en individuos no relacionados. La manera más habitual de hacerlo es mediante análisis de bondad de ajuste Chi-cuadrado. Para realizar este análisis hemos empleado el Test de Chi-cuadrado con la corrección por continuidad de Yates en el software Statcalc.

Para los análisis de Chi-cuadrado con más de un grado de libertad (distribuciones genotípicas, haplotípicas) hemos empleado el software SPSS.

Otras herramientas informáticas utilizadas en el transcurso de esta tesis doctoral, son varios software genéticos y bases de datos online que describimos a continuación.

Para el análisis del desequilibrio de ligamiento (LD) entre marcadores y construcción de haplotipos se realizaron las estimaciones mediante el software Phase y Gold. Phase implementa algunos métodos estadísticos para la reconstrucción de haplotipos a partir de los datos genotípicos de la población y estima los valores de D' y de la fracción de recombinación entre marcadores. El software Gold proporciona una representación gráfica de los valores de D' . Con el término desequilibrio de ligamiento (LD) entre marcadores se alude a la tendencia de estos a transmitirse juntos como consecuencia de la distancia física a la que se encuentran en el mismo cromosoma. Aunque la distancia

entre los loci es el principal factor determinante del grado de LD entre ellos, la tasa de recombinación en la región comprendida entre ambos puede modificar dicha relación. En ocasiones, marcadores muy alejados físicamente se transmiten juntos con mayor frecuencia de la esperada por la distancia entre ambos o, por el contrario, la existencia de puntos calientes o *hot-spots* de recombinación en el genoma puede determinar que marcadores muy próximos en el cromosoma se transmitan de manera independiente con una frecuencia elevada. El grado con el que dos marcadores tienden a transmitirse juntos se cuantifica mediante el parámetro D' , cuyos valores oscilan de -1 a +1. Un valor de $D' = \pm 1$ indica desequilibrio completo de ligamiento, es decir, siempre se transmiten juntos. La existencia de desequilibrio de ligamiento entre los loci permite la construcción de haplotipos, que no es más que la disposición ordenada en dirección 5'-3' de los alelos marcados analizados en cada una de las copias que poseemos de todos los genes autosómicos.

Para los estudios de asociación haplotípica y la estimación de sus frecuencias, hemos empleado fundamentalmente el software THESIAS (www.genecanvas.org). Este programa permite la determinación de los efectos haplotípicos mediante comparación con el haplotipo de referencia, normalmente el haplotipo más frecuente en la población. Para la estimación de haplotipos y las regresiones para los estudios de asociación, hemos empleado el software Whap.

RESULTADOS

El análisis pormenorizado de los diferentes datos aportan los siguientes resultados:

A. ESTUDIO GENERAL SOBRE 109 PACIENTES CON CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIROIDES.

1.- Edad y Sexo:

Los pacientes tenían edades comprendidas entre 19-78 años (edad media, 46,8 años), había 96 mujeres (88%) y 13 hombres (12%). Todos ellos fueron clasificados en 2 grupos según la edad, considerando la separación en 45 años para adaptarse a la clasificación internacional TNM (Pacini et al.2007).

EDAD	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Menor de 45	54	49.54%
Mayor de 45	55	50.46%

Tabla 10. Distribución de frecuencias según edad.

La distribución según edad, no mostró diferencias significativas, ya que en ambos casos (mayores y menores de 45 años), esta distribución era cercana al 50%, siendo del 49.54% para menores de 45 años y del 50.46% en los mayores de 45 años.

El sexo femenino fue el más frecuente en este estudio con un 88.07% (96 pacientes) mientras que los varones alcanzaron una frecuencia del 11.93% (13 pacientes).

SEXO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
HOMBRE	13	11.93%
MUJER	96	88.07%

Tabla 11. Distribución de frecuencia según sexo.

2.- Estudio de la función tiroidea:

Analizando los estudios funcionales tiroideos encontramos que el 88.07% (96 pacientes) eran eutiroides, el 8.26% (9 pacientes) hipertiroides y el 3.67% (4 pacientes) eran hipotiroides.

PRUEBA FUNCIONAL	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Eutiroides	96	88.07%
Hipertiroides	9	8.26%
Hipotiroides	4	3.67%

Tabla 12. Distribución de pacientes según pruebas tiroideas funcionales.

3.- Estudio ecográfico del nódulo sospechoso de neoformación:

La lateralidad de la ecografía según la localización del proceso fue derecha en 50 pacientes (45.87%), izquierda en otros 41 pacientes (37.61%), bilateral en 9 de ellos (8.26%) e istmica en 9 pacientes (8.26%).

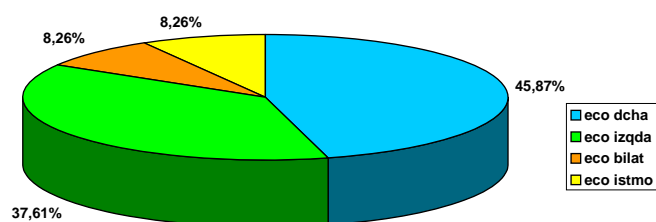


Figura 24. Diagrama de sectores representando la lateralidad de la ecografía

4.- Punción Aspiración con Aguja Fina (PAAF):

La Punción Aspiración con Aguja Fina se llevó a cabo en el lóbulo derecho en 50 pacientes (45.87%), en el lóbulo izquierdo en 41 pacientes (37.61%), en 9 pacientes de manera bilateral y otros 9 pacientes en el Istmo (8.26%).

LUGAR DE LA PAAF	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Lóbulo Derecho	50	45.87%
Lóbulob Izquierdo	41	37.61%
Bilateral	9	8.26%
Istmo	9	8.26%

Tabla 13. Distribución de pacientes según el lugar donde se realizó la PAAF.

Tras seguir los criterios establecidos en terminología y morfología para el diagnóstico citológico de las lesiones de la PAAF de tiroides, ésta fue informada como: “benigna con material coloide”, “proliferación folicular”, “sospechosa de malignidad”, “atipias celulares” y “no diagnóstico”. En el estudio histológico de los nódulos de tiroides diagnosticados mediante PAAF de

“proliferación folicular” se diagnosticaron nódulos hiperplásicos-adenomatosos, adenomas foliculares, carcinoma folicular y carcinoma papilar. Los resultados de la Punción Aspiración con Aguja Fina (PAAF) reflejan los siguientes datos: “benigno con material coloide” 26 pacientes (23.85%), sospechoso de malignidad 35 pacientes (32.11%), “atipia celular” 7 pacientes (6.42%), “proliferación folicular” 37 pacientes (33.95%), “no diagnóstico” 4 pacientes (3.67%).

PAAF PREOPERATORIO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Proliferación Folicular	37	33.95%
Sospechoso de malignidad	35	32.11%
Coloide Benigno	26	23.85%
Atipia Celular	7	6.42%
No Diagnóstico	4	3.67%

Tabla 14. Distribución de frecuencias en la PAAF preoperatoria.

5.- Técnica Quirúrgica:

La tiroidectomía total fue la técnica más común realizada en 90 pacientes (82.57%), la tiroidectomía casi total se practicó en 7 pacientes (6.42%). La hemitiroidectomía se realizó en 12 pacientes (11.01%), de los cuales 4 fue del lóbulo izquierdo (3.67%) y 8 en el lóbulo derecho (7.34%).

TIPO DE CIRUGÍA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Tiroidectomía Total	90	82.57%
Tiroidectomía “Casi Total”	7	6.42%
Hemitiroidectomía dcha.	8	7.34%
Hemitiroidectomía Izqda	4	3.67%

Tabla 15. Distribución de pacientes según el tipo de cirugía realizada.

La técnica habitual fue la realización de la cirugía en 1 tiempo o acto quirúrgico 91 pacientes (83.49%) mientras que la cirugía en 2 actos quirúrgicos representó el 16.51% (18 pacientes). En esta última 12 pacientes presentaron carcinoma papilar (3 microcarcinomas), 3 carcinoma folicular y 3 la variante folicular de carcinoma de células de Hürthle. Los carcinomas papilares fueron bilaterales en 3 casos (2 multifocales y 1 bifocal).

TIEMPOS DE CIRUGÍA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
1 tiempo	91	83.41%
2 tiempos	18	16.51%

Tabla 16. Distribución de frecuencias y tiempos de cirugía

6.- Diagnóstico anatomopatológico:

El diagnóstico histológico de los nódulos de tiroides extirpados mostró 91 pacientes (83.48%) de carcinoma papilar; en otros 11 pacientes (10.1%) se obtuvo una histología de Carcinoma Folicular y en 7 pacientes Carcinoma de Células de Hürthle (6.42%).

La media de tamaño tumoral fue 19,3(1-60) x 15,7(1-55) mm.

Comparando estos datos con la PAAF preoperatoria, observamos que en las PAAF diagnósticas de “proliferación folicular” se diagnosticaron 25 carcinomas papilares, 7 carcinomas foliculares y 5 carcinomas de células de Hürthle; En las PAAF con “atipias celulares” se diagnosticaron 4 carcinomas papilares, 2 carcinomas foliculares y 1 carcinoma de células de Hürthle; En las PAAF con “coloide benigno” se diagnosticaron 25 carcinomas papilares y 1 carcinoma folicular, en la PAAF “sospechosas de malignidad” se diagnosticaron 35 pacientes con carcinoma papilar; entre las PAAF “no diagnósticas” se diagnosticaron 2 carcinomas papilares, 1 carcinoma folicular y 1 carcinoma de la variante folicular de células de Hürthle.

	CARCINOMA PAPILAR	CARCINOMA FOLICULAR	VARIANTE FOLICULAR DE CARC CELULAS HÜRTHLE
“Proliferación folicular”	25	7	5
“Atipia celular”	4	2	1
“Sospechoso de malignidad”	35	-	-
“Coloide benigno”	25	1	-
“No diagnóstico”	2	1	1
TOTAL	91	11	7

Tabla 17. Comparativa de resultados histológicos con la PAAF preoperatoria.

Hubo invasión capsular en 16 pacientes (21.1%) y microinvasión en otros 10 (9.17%); el 69.72% de los pacientes (n=83), no tuvo invasión capsular.

Invasión capsular	Frecuencia	Porcentaje (%)
Si	16	14.68
No	83	76.15
Micro invasión	10	9.17

Tabla 18. Existencia de invasión capsular

El 90.83% de casos (99 pacientes) sufrieron invasión vascular, mientras que el 9.17% (10 pacientes) no la tuvo.

Invasión vascular	Frecuencia	Porcentaje (%)
Si	10	9.17
No	99	90.83

Tabla 19. Existencia de invasión vascular

Al analizar el número de pacientes que tenían ganglios linfáticos afectados y etiquetarlos según la clasificación TNM, se obtuvo que los pacientes en los que existía positividad de ganglios afectados fueron 26, de los cuales 25 eran de manera ipsilateral (22.94%) y un caso bilateral (0.92%). Hubo 83 casos sin afectación de los ganglios, es decir, negativos (76.15%).

Los datos se exponen en la siguiente tabla:

Ganglios linfáticos	Frecuencia	Porcentaje (%)
Negativo	83	76.15
Ipsilateral	25	22.94
Bilateral	1	0.92

Tabla 20. Existencia de Ganglios Linfáticos afectados

La mayoría de las mujeres del estudio pertenecían al estadio 1 con 47 casos (43.12%), en el estadio 2 hubo 23 pacientes (21.10%), 20 en el estadio 3 (18.35%) y 6 en el estadio 4 (5.50%); con respecto a los varones, hubo 2 en el estadio 1 (1.83%), 4 en el estadio 2 (3.67%), 5 en el estadio 3 (4.59%) y 2 en el estadio 4 (1.83%).

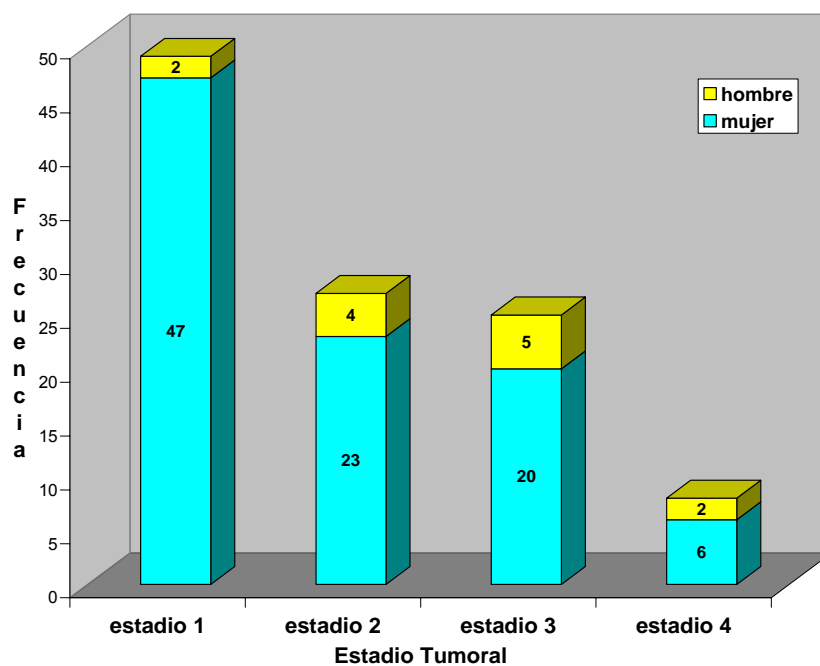


Figura 25. Diagrama sobre estadio respecto al sexo.

La gran mayoría de pacientes (49) pertenecieron al estadio 1 alcanzando una frecuencia del 44.95%; esta frecuencia disminuye a medida que aumenta el estadio observándose 27 pacientes para el estadio 2 (24.77%), 25 para el estadio 3 (22.94%) y sólo 8 pacientes en el estadio 4 (7.34%).

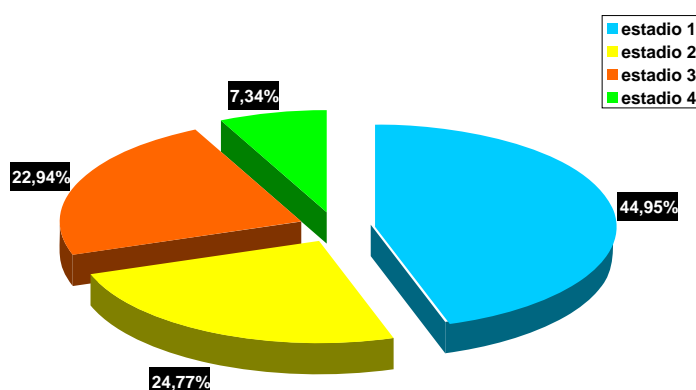


Figura 26. Diagrama de distribución de frecuencias según el estadio.

En casi todos los pacientes en los diferentes estadios, la cirugía se realizó en 1 tiempo. Sólo se realizó en 2 tiempos en 8 casos del estadio 1 (7.34%), 3 casos del estadio 2 (2.75%), 5 casos del estadio 3 (4.59%) y 2 casos del estadio 4 (1.83%).

La cirugía realizada más frecuentemente en todos los estadios fue la tiroidectomía total (TT), con 42 casos (38.53%) en el estadio 1, 20 casos en estadio 2 (18.35%), 21 casos en estadio 3 (19.27%) y 7 casos en estadio 4 (6.42%). El resto de cirugías realizadas (tiroidectomía casi total, hemitiroidectomías derecha e izquierda) oscilaron en los diferentes estadios entre los 0-4 casos.

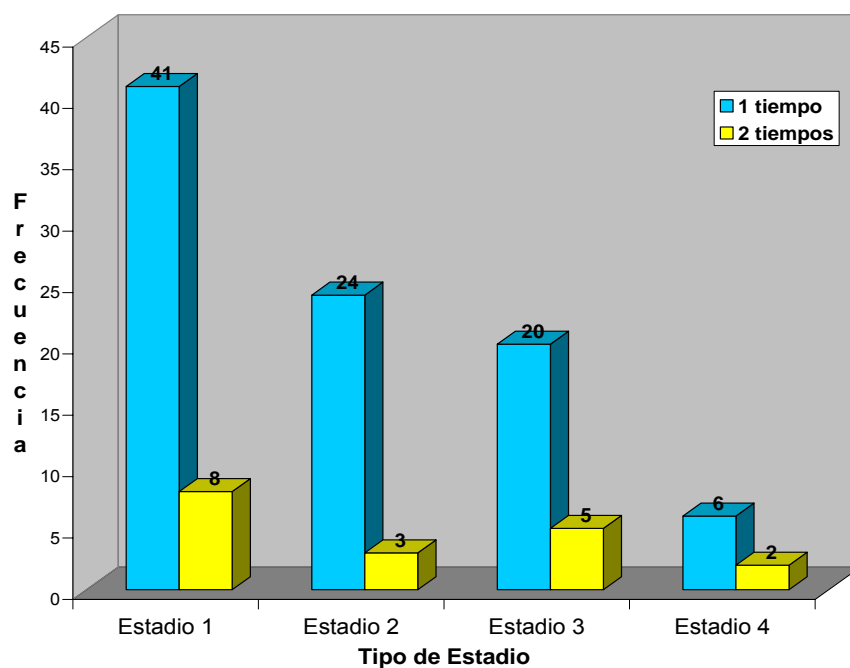


Figura 27. Diagrama de barras que representa el estadio y tiempos de realización de cirugía.

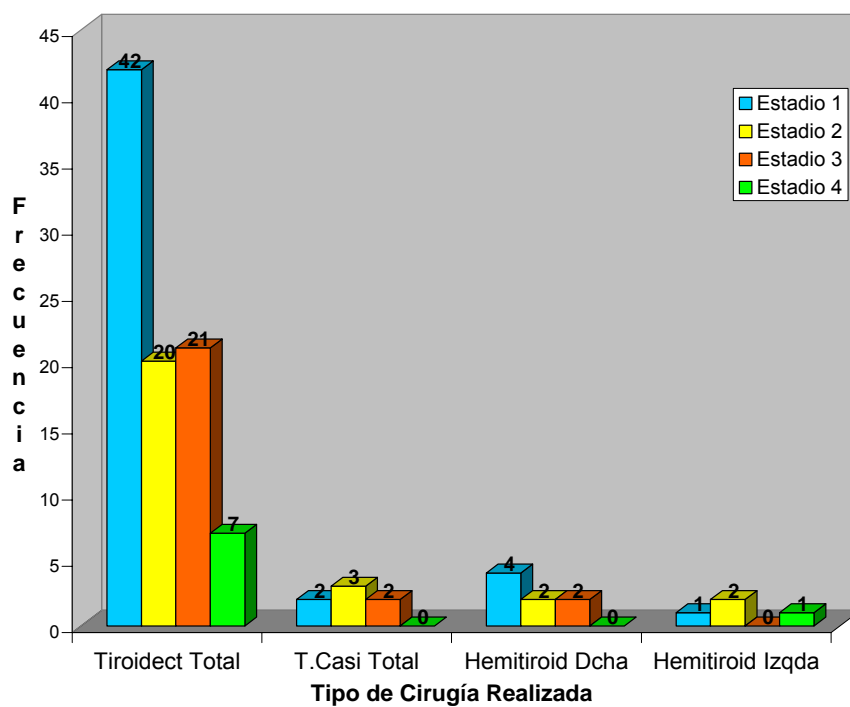


Figura 28. Diagrama de barras que representa estadio y tipo de cirugía.

El diagnóstico anatomopatológico más frecuente en todos los estadios fue el Carcinoma Papilar, con 45 pacientes en estadio 1 (41.29%), 23 pacientes en estadio 2 (21.1%), 19 pacientes en estadio 3 (17.43%) y 4 pacientes en estadio 4 (3.67%). En el caso del Carcinoma Folicular hubo 2 pacientes para el estadio 1 y otros 2 para el estadio 2 (1.83% en cada estadio), 3 pacientes para el estadio 3 (2.75%) y 4 pacientes para el estadio 4 (3.67%). Para el carcinoma de células de Hürthle no se encontraron pacientes en estadio 4, pero sí 2 pacientes en estadio 1 (1.83%), dos en estadio 2 (1.83%) y 3 pacientes en estadio 3 (2.75%).

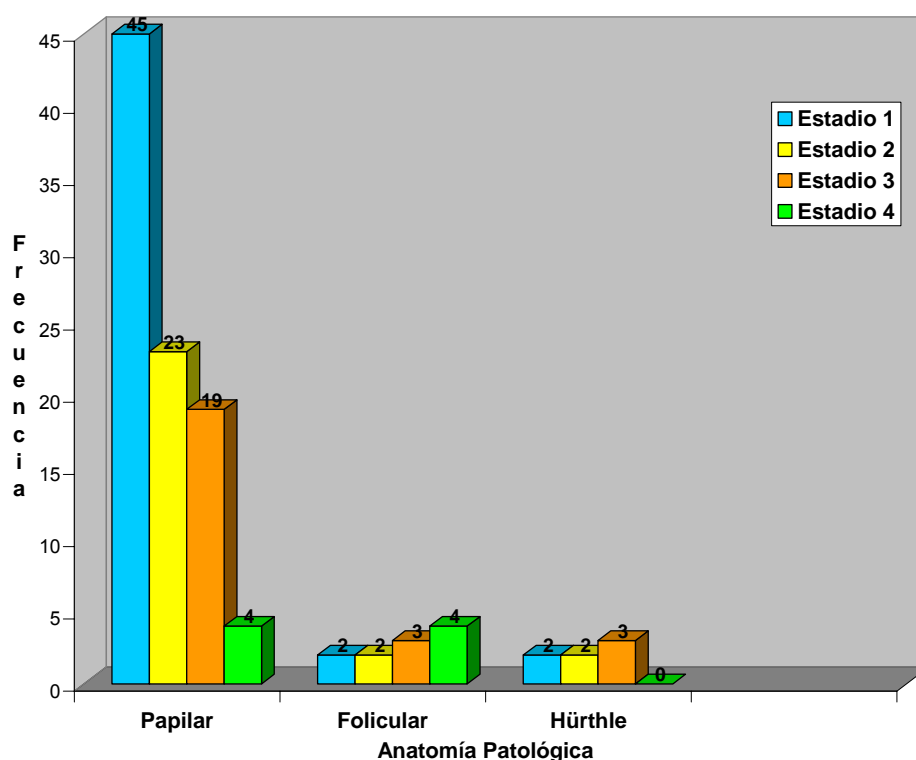


Figura 29. Diagrama de barras que representa el estadio respecto a la AP.

Solamente en el estadio 3 observamos la misma frecuencia de pacientes (n=10) en la presencia de invasión capsular y sin ella (9.17%) y 5 pacientes de

micro invasión (4.59%). En el resto de estadios, predomina la ausencia de invasión capsular con un 36.7% en el estadio 1, un 20.18% en el estadio 2 y un 1.83% en el estadio 4.

Estadio	Invasión capsular	No Invasión Capsular	Micro invasión
1	0	47	0
2	4	22	3
3	10	10	5
4	2	4	2

Tabla 21. Estadio e invasión capsular.

La invasión vascular sólo se observó en el estadio 4 con 8 casos (7.34%) y otros 2 casos en el estadio 3 (1.83%).

Estadio	Invasión Vascular	No Invasión Vascular
1	0	49
2	0	27
3	2	23
4	8	0

Tabla 22. Estadio e invasión vascular

B. ESTUDIO ESPECÍFICO SOBRE 41 PACIENTES CON CARCINOMA PAPILAR Y SU ESTUDIO GENÉTICO.

Al evaluar los datos referentes a los 41 pacientes en los que se realizó el estudio genético, se obtuvieron 2 tipos de resultados: los referentes a la primera parte del estudio, es decir, la parte descriptiva (sexo, edad, pruebas funcionales, tipo de cirugía y sus tiempos, invasión capsular y vascular) y los correspondientes al estudio genético.

1.- Análisis descriptivo:

La valoración de los datos descriptivos de los 41 pacientes en los que se realizó estudio genético, obtuvo los siguientes resultados:

La distribución de frecuencias de los individuos según la edad menor o mayor de 45 años es la siguiente:

EDAD	Frecuencia	Porcentaje
Menor de 45 años	20	48.78%
Mayor de 45 años	21	51.22%

Tabla 23. Distribución de edad en 41 pacientes.

En este estudio, la edad osciló entre los 23 y los 69 años. La diferencia respecto a la edad no fue significativa, ya que 20 pacientes (48.78%) eran

menores de 45 años y los otros 21 pacientes (51.22%) eran mayores de 45 años. Respecto al sexo de los pacientes: 35 eran mujeres (85.37%) y 6 eran hombres (14.63%). De estos 41 pacientes, 36 eran normotiroideos (87.8%) y 5 hipertiroides (12.2%).

SEXO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
HOMBRE	6	14.63%
MUJER	35	85.37%

Tabla 24. Distribución de sexo en 41 pacientes con estudio genético

El tipo de cirugía que se ha realizado se detalla en la siguiente tabla, observándose que la mayoría de pacientes, un 80.48% (n=33) fue sometido a tiroidectomía total. Los otros tres tipos de cirugía se realizaron en un número de pacientes similar, lo que refleja un 7.32% de tiroidectomía “casi total”, un 9.76% de hemitiroidectomía derecha y un 2.44% de hemitiroidectomía izquierda.

TIPO DE CIRUGÍA	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Tiroidectomía Total	33	80.48%
Tiroidectomía “Casi Total”	3	7.32%
Hemitiroidectomía derecha.	4	9.76%
Hemitiroidectomía Izquierda	1	2.44%

Tabla 25. Tipo de cirugía en los 41 pacientes del estudio genético

De estas intervenciones quirúrgicas 38 se realizaron en 1 sólo acto quirúrgico (92.68%) y 3 tuvieron que someterse a una segunda intervención (7.32%).

Hubo invasión capsular en 11 pacientes (26.83%), de los cuales 3 eran microinvasores; Hubo 4 casos con invasión vascular que conforman el 9.76%, siendo el 90.24 % restante (37 pacientes) libre de invasión vascular.

La afectación ganglionar sólo se observó en 6 casos de los 41 carcinomas papilares, como se detalla en la siguiente tabla:

GANGLIOS AFECTADOS	FRECUENCIA	PORCENTAJE
NO	35	85.37%
SI	6	14.63%

Tabla 26. Afectación ganglionar en 41 pacientes

2.- Análisis genético:

Inicialmente, se utilizó la pirosecuenciación para el genotipado y la cuantificación de las frecuencias de los alelos en todos los SNPs en 178 controles aleatorios de la población en general. Todos los marcadores exhiben un alto grado de heterocigosidad en la población control (media de heterocigosidad de 0,50). Esto confirmó la informatividad de la región antes de proceder al análisis de LOH. Para obtener los mejores resultados en la medición de la cuantificación alélica, es obligatoria una amplificación robusta. Idealmente, la señal de un solo pico debe ser de al menos 20 unidades relativas de luminiscencia (RLU).

Si bien es posible genotipar SNP con menores señales, se determinó que la cuantificación alélica es menos flexible para este parámetro. El uso de los datos con menor intensidad de la señal se traducirá en un aumento de variación de frecuencia muestra a muestra, así como un aumento de la influencia del ruido sobre la cuantificación. Por lo tanto, sólo las muestras con un máximo nivel de señal superior a 20 RLU se computaron. Los patrones de pirosecuenciación se utilizaron como referencia para la exacta estimación de las frecuencias alélicas de muestras periféricas de ADN genómico.

Entre los individuos heterocigotos para cada polimorfismo ($n > 50$ para cada caso), se calculó la cantidad media de alelo de cada uno. Como se muestra en la Tabla 27, las muestras de alelos heterocigotos mostraron un promedio que va desde 43,3% a 56,8% para los alelos de menor frecuencia. La desviación típica osciló entre el 1,8% y 4,5%. Estos resultados nos permiten definir el rango de frecuencia de oscilación para muestras heterocigotas en cada marcador, la definición de la gama de riesgos atribuibles a amplificación preferentemente alélica o no específicos de la señal para cada marcador.

Gen	Polimorfismo	Homocigoto (n=11) Alelo 1	Heterocigoto (n=12) Alelo 1	Homocigoto (n=22) Alelo 2	Heterocigosidad
EMSY	rs4300410	84.1±2.6	43.4±1.8	97.3±1.3	0.52
	rs2508760	100.0±0.0	47.0±2.9	96.3±1.5	0.52
	rs2251075	87.1±3.1	55.2±4.5	100.0±0.0	0.52
CAPN5	rs11237076	93.4±1.6	47.2±4.4	94.4±2.2	0.51
	rs4259851	96.8±0.9	48.8±2.2	97.4±0.8	0.57
	rs4945140	99.8±0.5	56.8±2.5	90.2±1.7	0.37
PAK1	rs2729762	98.4±0.6	43.3±1.8	96.3±1.2	0.54
	rs2844336	98.6±0.6	50.0±2.8	93.8±2.1	0.52
	rs538670	96.1±0.8	51.8±2.1	95.1±0.4	0.47

Tabla 27. Media de cuantificación alélica en muestras de sangre periférica.

Para evaluar la linealidad, exactitud y fiabilidad de la reacción de pirosecuenciación, se seleccionaron tres SNP, uno de cada gen. Amplificamos el ADN de ambos tipos de muestra salvaje y mutante en individuos homocigotos (n=10) y mezclado en distintas proporciones para cada alelo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40 y 50:50). El ADN fue sometido a genotipificación y cuantificación alélica mediante pirosecuenciación convencional. La primera extensión permitió medir los incrementos relativamente bajos de un alelo, ya que incluso los de muy pequeño porcentaje (10%) de un determinado alelo podría detectarse de manera fiable de acuerdo al pirograma.

Para un mejor conocimiento, este es el primer análisis detallado de la región que comprende el 1 Mb entre EMSY y PAK1 en PTC. Con estos experimentos, se pretende determinar si las muestras tumorales muestran LOH o no.

Caracterización de los bloques de desequilibrio de unión a lo largo de la región

Las frecuencias de genotipo observadas durante este estudio se encontraban en conformidad con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Para analizar el grado en que estos polimorfismos están en LD (linkage disequilibrium= desequilibrio de unión), se realizaron pares de análisis normalizados de LD (D'). El gen EMSY consistió en un único bloque de LD, ya que los 3 polimorfismos seleccionados estaban en LD completo ($p < 0,0001$). Resultados idénticos se obtuvieron para PAK1. La matriz pareada LD mostró que 2 de los principales bloques LD estaban presentes en genes CAPN5 (datos no mostrados). El primer bloque LD incluye rs11237076, y el segundo bloque LD incluye tanto rs4259851 y rs4945146 (Fig. 2, en rojo). Los dos bloques de alto desequilibrio de unión con el gen CAPN5 se intercalan con la presencia de un hot spot/"punto caliente" o una región de recombinación frecuente dentro de este gen.

Búsqueda de desequilibrio alélico en la región 11q13-q14

La tecnología de Pirosecuenciación permite la cuantificación de la intensidad atribuida a cada alelo. Basándose en las señales producidas por los dos alelos, se establece si una determinada muestra es homocigota o heterocigota para cada polimorfismo. Se analizan la media de cada alelo en muestras heterocigótica y homocigótica, comparando la cuantificación de muestras control de los tejidos con muestras de tejidos tumorales para determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre ellos. La intensidad media de los alelos fue casi un 50% en las muestras heterocigotos y la intensidad media de alelos fue cercana al 100% en muestras de homocigotos. Cuando la diferencia es superior a $50 \pm 5\%$ (rs2508760 tiene un promedio de 62,4 para el alelo tipo silvestre y el 37,6 para el alelo mutante) se considera que una amplificación alélica específica se ha producido.

Se analizan los SNP seleccionados en 41 muestras en pacientes con PTC y sus correspondientes muestras no tumorales. En el estudio de desequilibrio alélico, se considera un caso informativo para un marcador cuando su ADN genómico correspondiente (no tumoral) es heterocigoto.

Por lo tanto, 31 muestras normales (75,6%) son heterocigotas para al menos un polimorfismo del gen EMSY, 80,5% de las muestras normales son informativos para el gen CAPN5 y el 68,3% son informativo para el gen PAK1.

En todos los casos informativos, el tumor exhibe en las muestras, patrones indistinguibles de los de las muestras del tejido sano, lo que concluye que no se ha producido desequilibrio alélico en ningún espécimen estudiado. Por lo tanto, hay una ausencia total de desequilibrio alélico en los loci de los genes EMSY, CAPN5, y en PAK1 para la serie de casos de PTC (que se resumen en la Tabla 28).

GEN	MARCADOR	ALELO CONTROL SALVAJE HETEROCIGOTO	ALELO TUMORA MUTADO HETEROCIGOTO	ALELO CONTROL SALVAJE HOMOCIG	ALELO CONTROL MUTADO HOMOCIG	ALELO TUMORAL SALVAJE HOMOCIG	ALELO TUMORAL MUTADO HOMOCIG
EMSY	rs4300410	45.5±3.5	46.3±3.7	89.3±3.7	95±2	89.0±4.0	94.0±3
	rs2508760	62.4±2.7	61.3±1.7	100	89.7±3.7	100	90.0±4.4
	rs2251075	51.3±3.6	50.0±4.0	92.4±2.7	98.0±1.9	95.0±2.0	95.7±4.1
CAPN5	rs11237076	46.6±5.0	47.5±4.9	91.3±2.6	92.8±2.9	91.0±3.2	93.5±2.9
	rs4259851	53.7±2.5	53.2±3.9	96.1±0.7	96.5±1.3	95.6±1.1	97.7±1.3
	rs4945146	49.8±3.4	50.9±3.7	96.6±3.4	96.3±1.1	97±3.0	96.5±1.3
PAK1	rs2729762	56.5±2.1	54.7±2.2	96.0±2.8	96.7±0.9	96.3±2.1	96±1.4
	rs2844336	51.5±1.8	52.3±1.9	96.8±1.4	90.7±1.8	97.1±1.3	91.6±0.8
	rs538670	52.7±2.4	51.9±4.1	94.6±1.9	96.0±1.4	95.9±1.8	94.6±0.4

Tabla 28- Comparación de Media de intensidades alélicas entre control y tejido tumoral.

Comparación de haplotipo caso-control

El genotipado de los 9 polimorfismos utilizando ADN germinal de pacientes de PTC también brindó la oportunidad de investigar, aunque en un número relativamente pequeño de casos, los posibles efectos de los polimorfismos en los genes EMSY, PAK1 y CAPN5 sobre el riesgo de padecer PTC.

Por lo tanto, tratamos de investigar la frecuencia alélica, distribución genotípica y haplotípica de 9 polimorfismos simples de nucleótido en 41 pacientes con PTC comparándolo con 178 pacientes controles sanos. La

frecuencia de alelo común en la población osciló entre 0,53 y 0,69. En conjunto la frecuencia de los alelos y el genotipo no fueron significativamente diferentes entre casos y controles, no hay indicios de que estos polimorfismos influyan en el riesgo de padecer cáncer de tiroides en nuestra población.

Por último, se realizó el análisis basado en haplotipo utilizando diferentes software. En nuestra serie, los 3 marcadores EMSY generaron 3 haplotipos únicos con frecuencias que van de 13,9% a 43,8%. Los 3 polimorfismos CAPN5 originaron 6 haplotipos comunes (frecuencias de 8,9% a 33,2%) y las combinaciones de los 3 polimorfismos de PAK1 originaron 4 haplotipos comunes (frecuencias de 1,2% a 38,1%). (Tabla 29).

Para simplificar, los alelos de tipo salvaje están representados como "1", mientras que los alelos mutantes son representados como "2". Los haplotipos con una prevalencia inferior al 5% fueron excluidos del estudio, con el fin de minimizar el poder de la pérdida.

Curiosamente, hemos observado diferencias en la distribución del haplotipo EMSY de los pacientes con PTC en comparación con la población general. El efecto global del haplotipo no fue estadísticamente significativo para el cáncer papilar de tiroides, aunque se observó una tendencia a la asociación ($p = 0,07$). No hay asociaciones globales importantes entre los genes analizados ($p = 0,77$ para gen CAPN5 y $p = 0,84$ para gen PAK1).

Además, en el análisis de haplotipo encontramos que el haplotipo EMSY 111 estaba sobre representado en los casos de PTC en comparación con los controles, lo que podía conferir cierta predisposición genética a PTC ($p = 0,02$, odds ratio = 2,00).

Estos resultados han sido confirmados con la realización de un test de asociación haplotípica basado en un modelo de regresión ($p = 0,08$) y el valor de p empírico específico para el haplotipo 111 después de las permutaciones de la prueba fue aún más baja ($p = 0,01$). Cuando las frecuencias de los haplotipos CAPN5 y PAK1 han sido comparadas con casos y controles, no ha

habido diferencias estadísticas. Sin embargo, dado el pequeño tamaño de la muestra, un aumento de la misma en futuros estudios de PTC será necesario para poder verificar estos resultados preliminares.

Gen	Haplotipo	Controles (n=178)		PTC Pacientes (n=41)		Análisis Estadístico	
		Cromosomas	%	Cromosomas	%	P	OR
EMSY	111	47	13.9	20	24.4	0.02*	2.00
	112	143	42.3	29	35.4	-	-
	221	148	43.8	33	40.2	-	-
	Efecto haplotípico global $\chi^2=5.32$ d.f.=2					0.07**	
CAPN5	111	118	33.2	22	27.2	-	-
	121	32	8.9	11	13.8	0.1	1.61
	122	54	15.2	11	14.0	-	-
	211	76	21.3	17	21.6	-	-
	221	35	9.9	8	10.0	-	-
	222	41	11.5	11	13.4	-	-
	Efecto haplotípico global $\chi^2=2.51$ d.f.=5					0.77	
PAK1	111	103	29.1	26	31.7	-	-
	112	107	30.2	26	31.7	-	-
	121	9	2.6	1	1.2	-	-
	221	135	38.1	29	35.4	-	-
	Efecto haplotípico global $\chi^2=0.85$ d.f.=3					0.84	

Tabla 29.- Comparación de la frecuencia de los haplotipos de los genes EMSY, CAPN5 y PAK1 entre pacientes con cáncer papilar de tiroides y población general española.

- * p: efecto del haplotipo usando Thesias Software
- ** p efecto haplotípico global usando Whap software
- No significativo

La descripción de los pacientes refleja que sólo existe un individuo con estadio 4. La distribución de frecuencias de los individuos según estadio es:

ESTADIO	Frecuencia	Porcentaje (%)
1	21	51.22
2	13	31.71
3	6	14.63
4	1	2.44

Tabla 30. Frecuencia de estadios en los 41 pacientes

La mayoría de casos pertenecen al estadio 1 con un 51.22%, el resto de estadios tienen un 31.71% en el estadio 2 y los estadios menos frecuentes con el 3 y el 4 con un 14.63% y 2.44% respectivamente.

La distribución de frecuencias de los individuos según el polimorfismo al que pertenecen y su genotipo se detalla en las siguientes tablas:

Para el polimorfismo del GEN EMSY y sus 3 variantes:

EMSYi17CG	Frecuencia	Porcentaje
CC	12	29.27%
CT	25	60.98%
TT	4	9.76%

Tabla 31a

EMSYi860AC	Frecuencia	Porcentaje
AA	12	29.27%
AC	25	60.98%
CC	4	9.76%

Tabla 31b

EMSY17CG_A	Frecuencia	Porcentaje
CC	17	41.46
CG	19	46.34
GG	5	12.20

Tabla 31c

Tabla 31. Genotipos de los 3 polimorfismos del gen EMSY; a) genotipo del polimorfismo EMSYi17CG; b) genotipo del polimorfismo EMSYi860AC; c) genotipo del polimorfismo EMSY17CG_A.

Para el polimorfismo EMSYi17CG el genotipo más frecuente era el CT y después el CC, sólo hubo 4 casos (9.76%) con genotipo TT. El genotipo AC fue

el más abundante en el polimorfismo de EMSY i860AC con 25 casos (60.98%). En el caso del polimorfismo de EMSY 17CG_A, el genotipo más frecuente fue el CG con 19 casos, seguido del CC con 17 casos. Sólo hubo 5 pacientes con genotipo GG.

Para el polimorfismo del GEN CAPN5 y sus 3 variantes

CAPN5UT4	Frecuencia	Porcentaje
CC	12	30.00%
CT	20	50.00%
TT	8	20.00%

Tabla 32a

CAPN5I10	Frecuencia	Porcentaje
CC	12	29.27%
TC	17	41.46%
TT	12	29.27%

Tabla 32b

CAPN5I12	Frecuencia	Porcentaje
CC	6	14.63%
TC	10	24.39%
TT	25	60.98%

Tabla 32c

Tabla 32. Genotipos de los 3 polimorfismos del gen CAPN5; a) genotipo del polimorfismo CAPN5UT4; b) genotipo del polimorfismo CAPN5I10; c) genotipo del polimorfismo CAPN5I12.

No tuvo ninguna relevancia clínica u otra significación el tipo de genotipo ni su frecuencia dentro del polimorfismo para el gen CAPN5.

Para el polimorfismo del GEN PAK1 y sus 3 variantes:

PAK162CT	Frecuencia	Porcentaje
CC	4	9.76%
CT	21	51.22%
TT	16	39.02%

Tabla 33a

PAK136AG	Frecuencia	Porcentaje
AA	16	39.02%
AG	20	48.78%
GG	5	12.20%

Tabla 33b

PAK170CT	Frecuencia	Porcentaje
CC	18	43.90%
CT	20	48.78%
TT	3	7.32%

Tabla 33c

Tabla 33. Genotipos de los 3 polimorfismos del gen PAK1; a) genotipo del polimorfismo PAK162CT; b) genotipo del polimorfismo PAK136AG; c) genotipo del polimorfismo PAK170CT.

Para el gen PAK, los diferentes polimorfismos y sus correspondientes genotipos más habituales (CT, AG y CT para los 3 polimorfismos respectivamente) no fue de importancia respecto al estudio.

La distribución de los genes condicionado a la evolución del estadio y su estudio bivariable es reflejado en la siguiente tabla:

		ESTADIO			
	N=41	1 n=21 (%)	2 n=13 (%)	3-4 n=7 (%)	p- value
EMSYi17CG	CC	5(23.81)	5(38.46)	2(28.57)	0.8297
	CT	13(61.90)	7(53.85)	5(71.43)	
	TT	3(14.29)	1(7.69)	0(0.00)	
EMSYi860AC	AA	5(23.81)	5(38.46)	2(28.57)	0.8297
	AC	13(61.90)	7(53.85)	5(71.43)	
	CC	3(14.29)	1(7.69)	0(0.00)	
EMSYi17CG_A	1CC	9(42.86)	5(38.46)	3(42.86)	0.2458
	1CG	11(52.38)	4(30.77)	4(57.14)	
	1GG	1(4.76)	4(30.77)	0(0.00)	
CAPN5UT4	CC	5(25.00)	6(46.15)	1(14.29)	0.1040
	CT	11(55.00)	3(23.08)	6(85.71)	
	TT	4(20.00)	4(30.77)	0(0.00)	
CAPN5I10	CC	6(28.57)	5(38.46)	1(14.29)	0.4973
	TC	7(33.33)	5(38.46)	5(71.43)	
	TT	8(38.10)	3(23.08)	1(14.29)	
CAPN5I12	CC	4(19.05)	2(15.38)	0(0.00)	0.1851
	TC	5(23.81)	1(7.69)	4(57.14)	
	TT	12(57.14)	10(76.92)	3(42.86)	
PAK162CT	CC	0(0.00)	2(15.38)	2(28.57)	0.0819
	CT	14(66.67)	5(38.46)	2(28.57)	
	TT	7(33.33)	6(46.15)	3(42.86)	
PAK136AG	AA	7(33.33)	6(46.15)	3(42.86)	0.3189
	AG	13(61.90)	5(38.46)	2(28.57)	
	GG	1(4.76)	2(15.38)	2(28.57)	
PAK170CT	CC	8(38.10)	5(38.46)	5(71.43)	0.6252
	CT	11(52.38)	7(53.85)	2(28.57)	
	TT	2(9.52)	1(7.69)	0(0.00)	
EDAD	Mayor de 45 años	7(33.33)	9(69.23)	5(71.43)	0.0584

Tabla 34. Distribución de genes según estadio.

Debido a que no podemos rechazar la hipótesis nula de independencia entre el estadio y los genes, p-valor mayor de 0.05, es interesante estudiar de forma exploratoria la atracción y repulsión entre genes y estadios. Para ello

utilizamos el análisis de correspondencias simple y múltiple con el que describiremos esta asociación no estadísticamente significativa e indicaremos relaciones que podrían ser los nuevos caminos para futuros estudios.

Detallamos los conceptos claves en el análisis de correspondencia:

- 1- Diremos que existe atracción entre dos categorías cuando la asociación es favorable entre ellas, es decir, el porcentaje de un suceso A condicionado a otro suceso B, probabilidad condicionada, es mayor que el porcentaje de ese suceso A, probabilidad marginal. Expresado de otra manera el porcentaje condicionado es mayor que el porcentaje medio.
- 2- Definiremos repulsión entre dos categorías cuando la asociación sea desfavorable entre ellas, es decir, el porcentaje de un suceso A condicionado a otro suceso B, probabilidad condicionada, es menor que el porcentaje de ese suceso A, probabilidad marginal.
- 3- Dimensión: Ejes artificiales que reflejan las asociaciones entre categorías. El número de dimensiones totales explica la totalidad de los datos.
- 4- Inercia es por definición una medida de distancia. Una mayor inercia implica una mayor variabilidad en nuestros datos. En el análisis de correspondencia se trabaja con la proporción de inercia explicada por las dimensiones, esta proporción indica cuanto explica la dimensión del conjunto de los datos. Cuantifica la acentuación de la relación entre categorías.
- 5- Gráficos: Proyección de las categorías en las dimensiones. Aquellos puntos con posiciones menos alejadas indican una mayor atracción.

Análisis de correspondencia variable EMSY.

1- Análisis de correspondencia simple entre gen EMSYi17CG y estadio.

No se detecta asociación estadísticamente significativa entre el gen EMSYi17CG y estadio, las categorías del estadio son 1, 2 y agrupados 3 y 4, con p-valor 0.8297. El estudio de la tabla 34 permite la elaboración y descripción de la relación entre categorías, el análisis de correspondencia establece esas relaciones de forma exploratoria. Analizando los datos podemos concluir que necesitamos dos dimensiones para explicar la tabla de contingencia, debido a que la dimensión 1 explica el 69.9% y la dimensión 2 el 30.1% de la inercia. La dimensión 1 explica la relación de atracción entre el gen TT y el estadio 1 y la repulsión entre ese gen y los estadios 2, 3 y 4. La dimensión 2 expresa la relación entre el gen CC y el estadio 2, por otro lado, la relación entre el estadio 3 y 4 y el gen CT. Gráficamente podemos estudiar estos fenómenos a través de la figura 31.

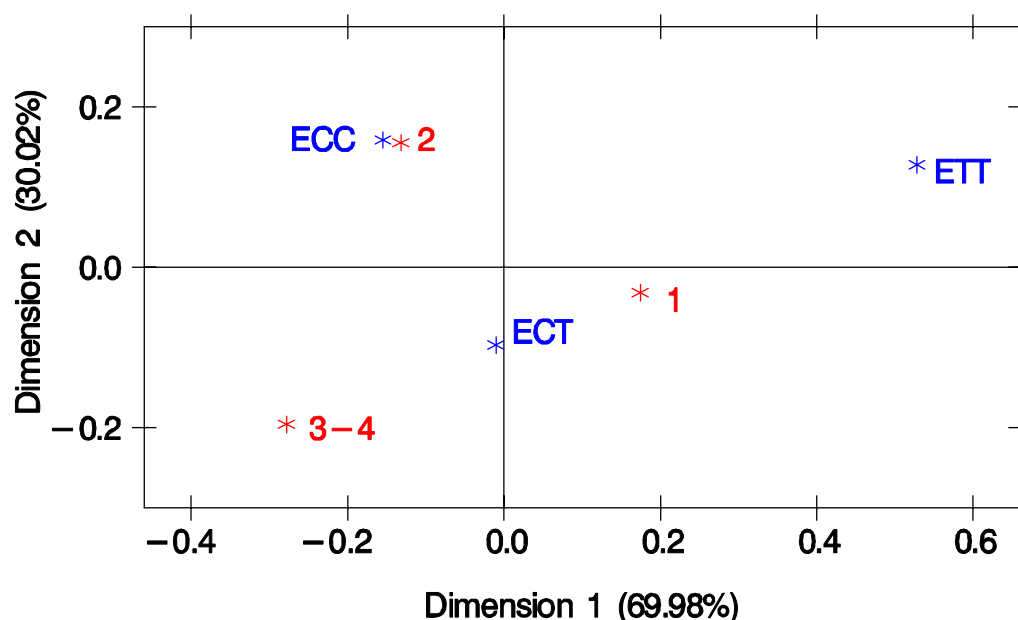


Figura 30. Correspondencia entre el gen EMSYi17CG y los 4 estadios.

2- Análisis de correspondencia simple gen EMSYi17CG_A y estadio.

La asociación estadística entre gen EMSYi17CG_A y estadio no resulto significativa, con p-valor igual a 0.2458. El análisis de correspondencia simple refleja que una sola dimensión explica el 99.9% de la inercia. De forma exploratoria tenemos que, gen 1CG y 1CC está asociado con el estadio 1, 3 y 4, y a su vez estos estadios se repelen con la categoría del gen 1GG. El estadio 2 es atraído por el gen 1GG y repelido por los genes 1CG y 1CC.

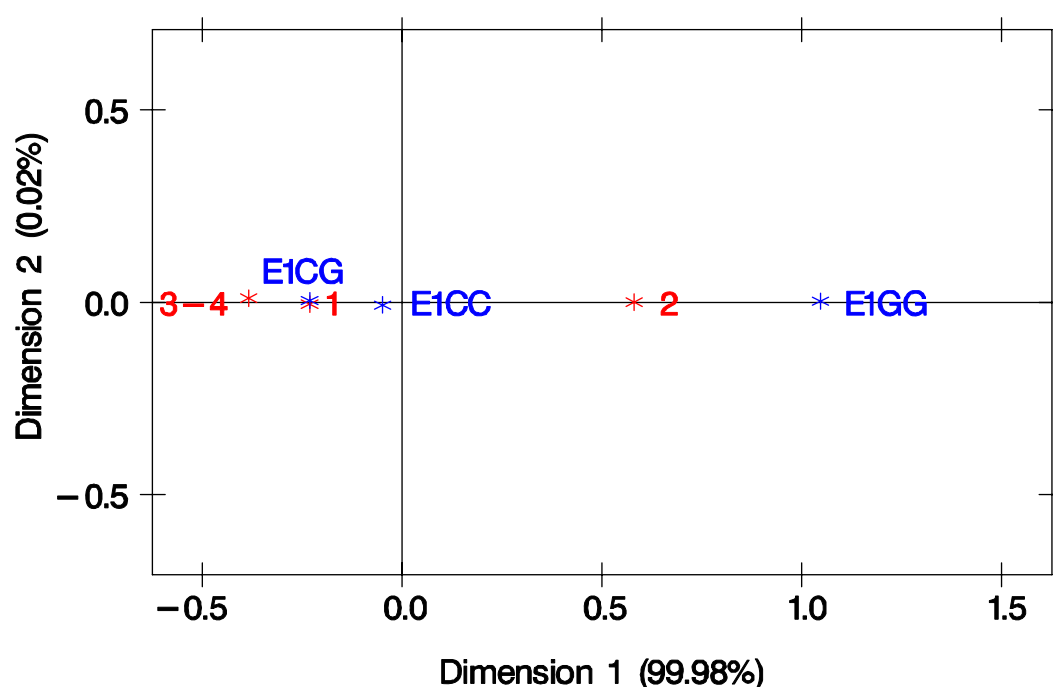


Figura 31. Correspondencia entre polimorfismo EMSYi17CG_A y estadios

3- Análisis de correspondencia múltiple gen EMSY.

El análisis de correspondencia múltiples muestra para el gen EMSY nos fuerza a estudiar gran parte de las dimensiones debido a la ausencia de dependencia entre las variables, mostrado por la inercia que queda explicada por cada una de las dimensiones. Indicamos que la imagen global de la relación es marcada por la primera dimensión con un 29.83% de la variabilidad explicada, y que las

demás explican aspectos de relaciones particulares. Explorando las dos primeras dimensiones encontramos que explican el 50% de la inercia, detallando que la primera dimensión nos muestra una diferenciación entre el estadio 2 y el resto de estadios. También aparece reflejada la atracción entre el estadio 2 y los genes CC y 1GG, marcando la repulsión entre estos genes y el resto de estadios. La dimensión 2 que explica el 23.32% de la variabilidad muestra la atracción entre estadio 3 y 4 y el gen 1CG, y la repulsión del estadio 3 y 4 frente al gen TT. La representación gráfica aparece reflejada en la figura 33.

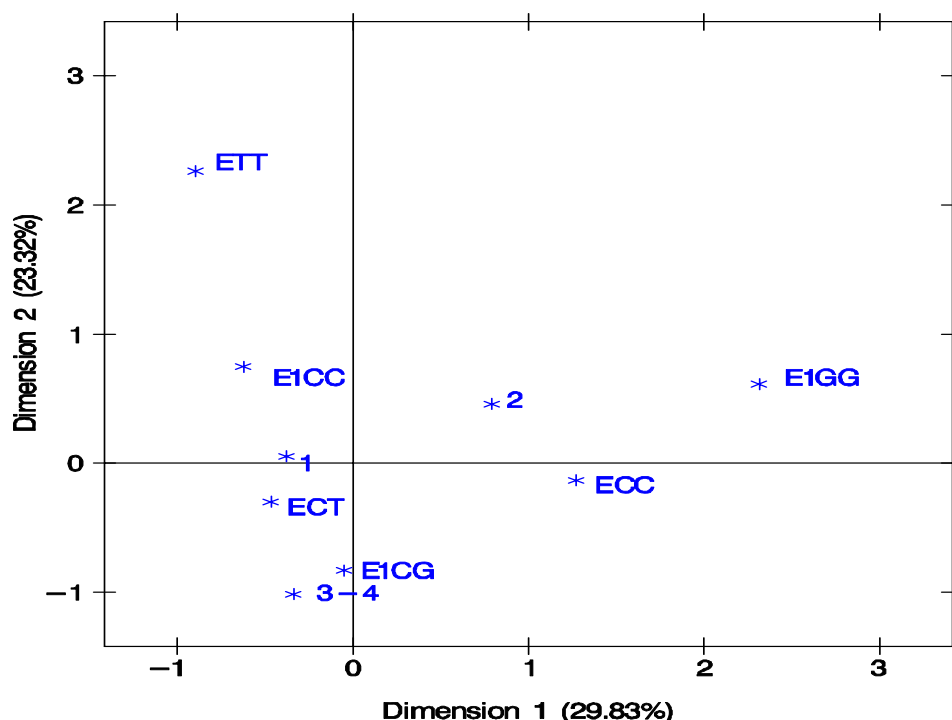


Figura 32. Correspondencia de los polimorfismos del gen EMSY y los estadios

Análisis de correspondencia variable CAPN5.

1- Análisis de correspondencia simple entre gen CAPN5UT4 y estadio.

No podemos rechazar con los datos obtenidos en la tabla 34 la hipótesis nula de independencia entre el gen CAPN5UT4 y los estadios, p-valor igual a 0.1024. El análisis de correspondencia simple muestra que con una sola

dimensión queda explicada prácticamente la totalidad de la inercia (97.58%). La dimensión 1 muestra la atracción entre estadio 2 y gen 4CC y 4TT. La repulsión entre estadio 2 y gen 4CT. También, la relación favorable entre los estadios 3 y 4 y el gen 4CT, y por otro lado, la relación desfavorable entre los estadios 3 y 4 y los genes 4CC y 4TT.

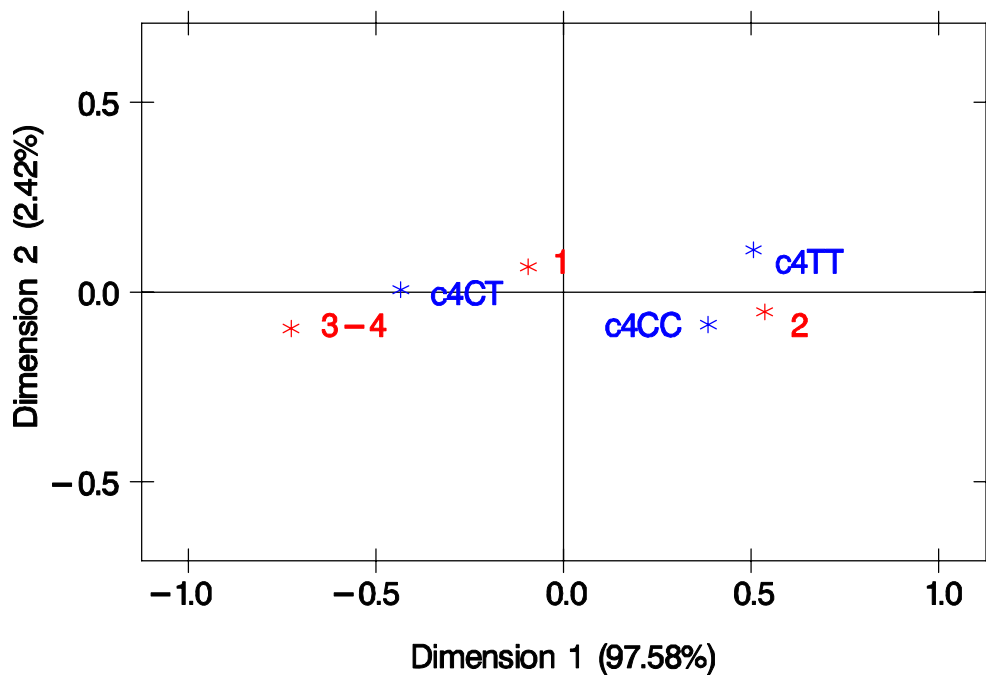


Figura 33. Análisis de correspondencia entre el polimorfismo CAPN5UT4 y los estadios.

2- Análisis de correspondencia simple entre gen CAPN5I10 y estadio.

El estudio de la tabla de contingencia y el test estadístico de la chi-cuadrado nos lleva a no poder rechazar la hipótesis nula de independencia con p-valor igual a 0.4973. El análisis de correspondencia simple explora las posibles asociaciones. De esta manera, queda expresado la relación entre el estadio 1 y el gen 0TT, la atracción entre el gen 0TC y los estadios 3 y 4. Además la asociación favorable entre el estadio 2 y el gen CC y la asociación desfavorable entre el estadio 2 y los genes 0TC.

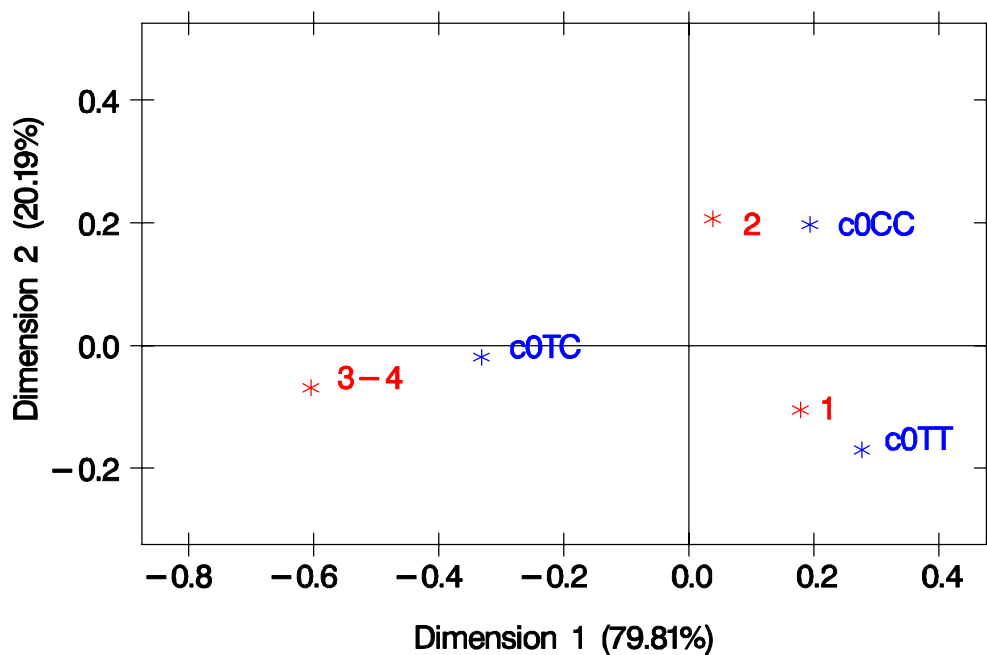


Figura 34. Análisis de correspondencia entre CAPN5i10 y estadios

3- Análisis de correspondencia simple entre gen CAPN5i12 y estadio.

El no rechazo de la hipótesis nula de independencia nos conduce a emplear el análisis de correspondencia de manera exploratoria. En este análisis encontramos que la dimensión primera explica el 90.73% de la inercia, quedando en la dimensión 2 el resto. La dimensión primera muestra la separación entre estadio 2 y los estadios 3 y 4. Asociando de manera favorable la relación entre los estadios 3 y 4 y el gen 2TC, por otro lado la atracción entre el estadio 2 y el gen 2TT. La dimensión 2 explica la atracción entre estadio 1 y gen 2CC y la repulsión entre este estadio y el gen 2TT.

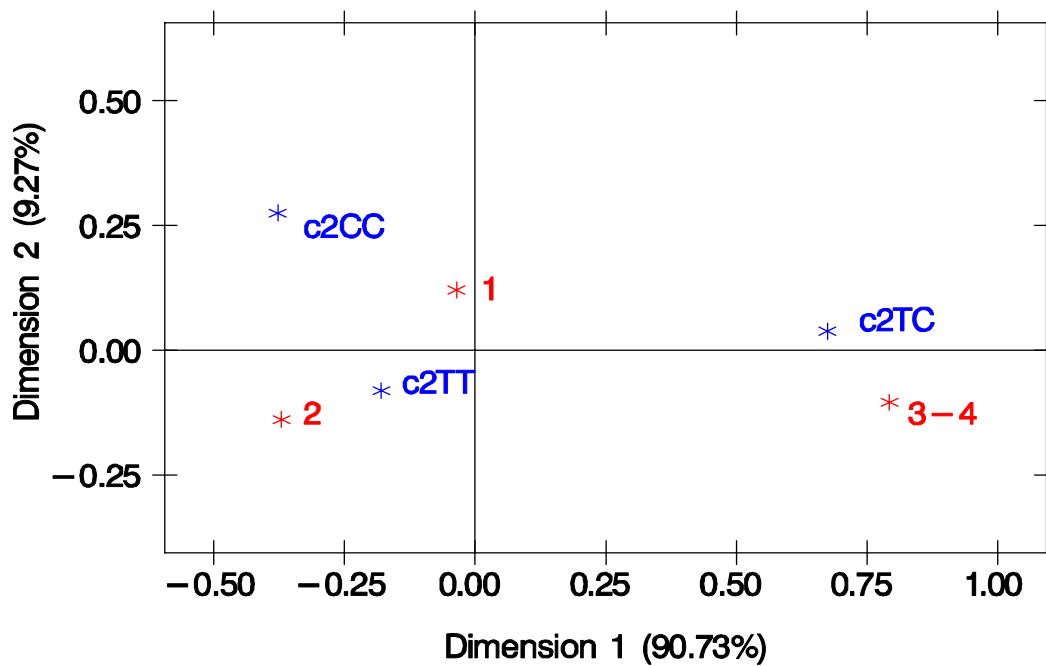


Figura 35. Análisis de correspondencia entre CAPN5i12 y estadio.

4- Análisis de correspondencia múltiples entre gen CAPN5 y estadio.

Encontramos la necesidad de estudiar un amplio rango de dimensiones para explicar las asociaciones. Si decidimos seleccionar sólo las tres dimensiones encontramos que el 60.81% de la inercia es explicada por ellas y encontramos que a partir de la tercera dimensión se comienza a detallar atracciones particulares. Comentando lo percibido en las dos primeras encontramos que los estadios 3 y 4 están asociados positivamente con los genes 2TC y 0TC y negativamente con los genes 2CC, 0CC, 4CC, 2TT, 0TT y 4TT. Por otro lado encontramos que el estadio 2 tiene atracción con los genes 4CC, 2TT, 0TT y 4TT. Detallamos que el estadio 1 es similar al comportamiento medio sin diferenciar por genes, posicionamientos centrales en los gráficos de dimensiones.

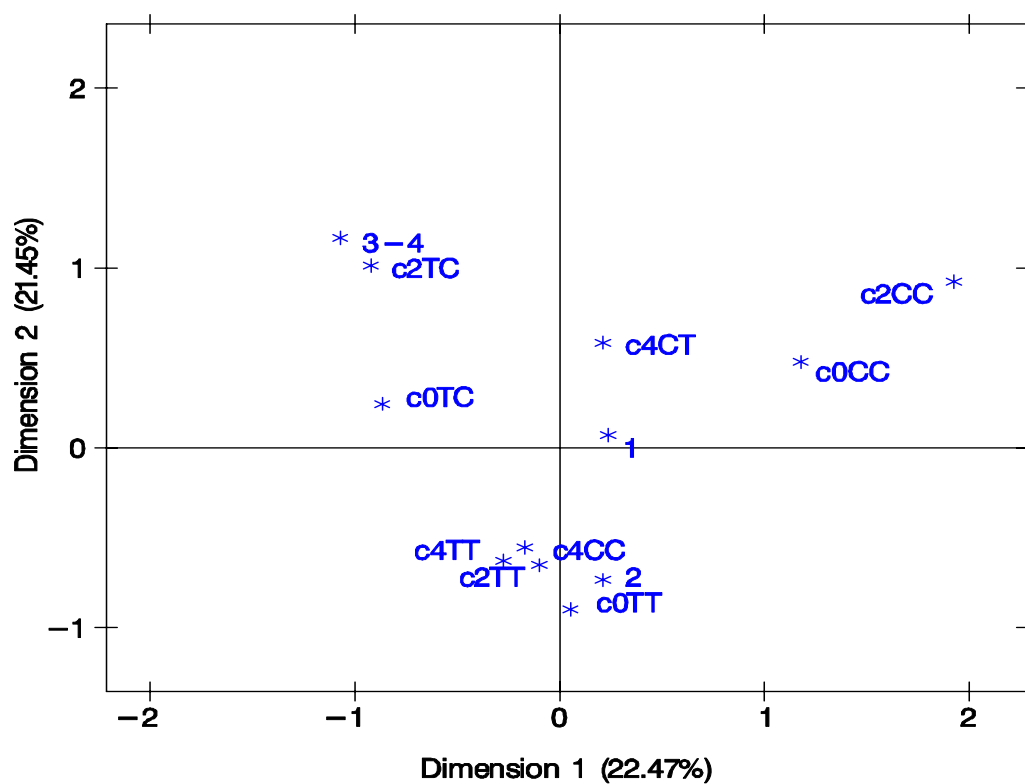


Figura 36. Correspondencia múltiple entre los 3 polimorfismos del gen CAPN5 y los estadios en dimensiones 1 y 2.

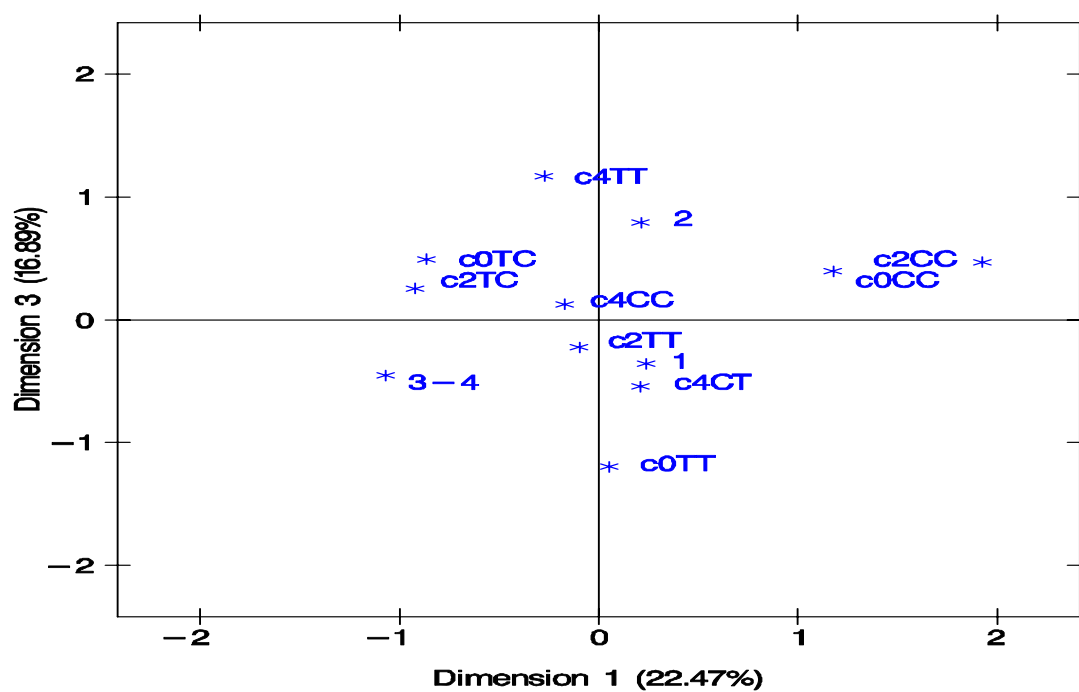


Figura 37. Correspondencia múltiple del gen CAPN5 y los estadios en las dimensiones 1 y 3.

Análisis de correspondencia variable PAK.

1- Análisis de correspondencia simples entre gen PAK162CT y estadio.

Estudiando la tabla de contingencia encontramos que no existe relación entre la variable estadio y el gen PAK162CT, con p-valor igual a 0.0819. La exploración de los datos a través del análisis de correspondencia nos indica, que una sola dimensión captura prácticamente toda la inercia, 97.89%. Las dimensiones nos informan de la atracción entre los estadios 2, 3 y 4 con el gen 6CC, por otro lado, la asociación favorable del estadio 1 por el gen 6CT y, por último, la relación positiva entre estadio 2 y gen 6TT. La primera dimensión también explica la repulsión entre estadio 2, 3 y 4 y gen 6CT, y además la repulsión entre estadio 1 y gen 6CC.

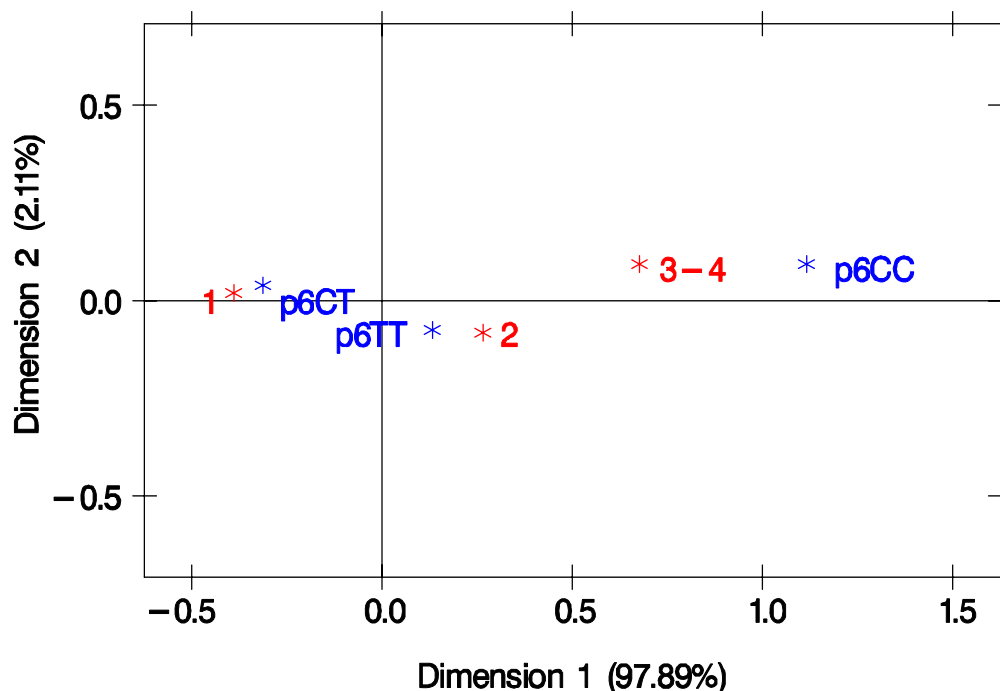


Figura 38. Correspondencia entre el polimorfismo PAK162CT y los estadios.

2- Análisis de correspondencia simples entre gen PAK136AG y estadio.

El estudio de la tabla de contingencia a través del test de la chi-cuadrado nos lleva a no poder rechazar la hipótesis de independencia entre el gen PAK136AG y los estadios con p-valor igual a 0.3189. A través del análisis de correspondencia observamos que los estadios 3 y 4 están asociados favorablemente con el gen 3GG y desfavorablemente con los genes 3AG y 3AA. Además, podemos observar que el estadio 2 tiene un comportamiento similar a los estadios 3 y 4, excepto que ese estadio está atraído por el gen 3AA además de atraerse por el gen 3GG. Por último, el estadio 1 es atraído por el gen 3AG y repelido por el gen 3GG. Podemos observar estos comportamientos en la figura 40.

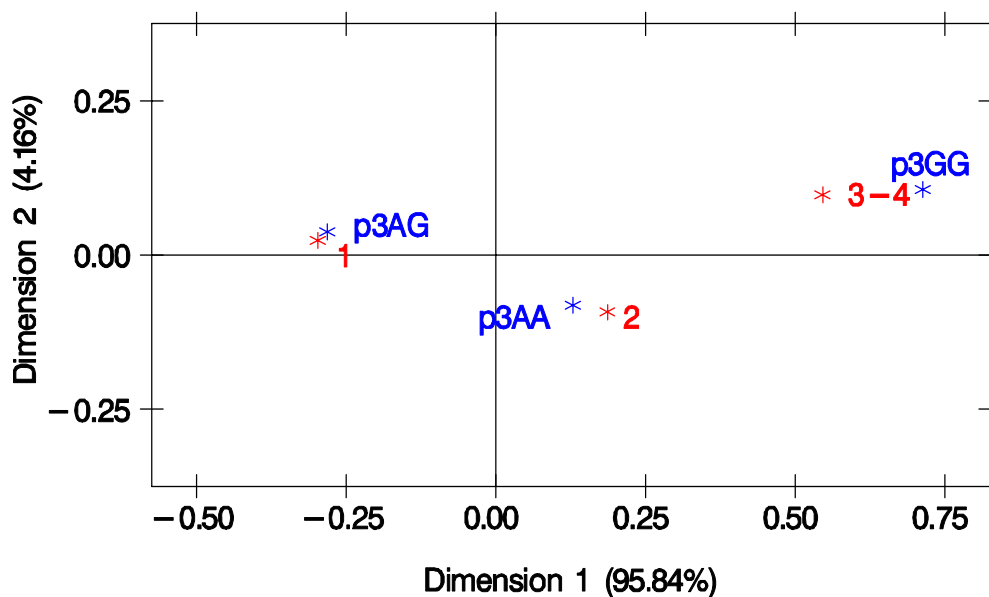


Figura 39. Correspondencia entre el polimorfismo PAK136AG y los estadios.

3- Análisis de correspondencia simples entre gen PAK17OCT y estadio.

Nuevamente, no podemos rechazar la hipótesis nula de independencia con p-valor igual 0.6252. Las dimensiones del análisis de correspondencia nos

informan de la asociación existente entre los estadios 3 y 4 y el gen 7CC y la repulsión de estos estadios con los genes 7TT y 7CT. En cambio, los estadios 1 y 2 si están relacionados con los genes 7TT y 7CT, y repelidos por el gen 7CC.

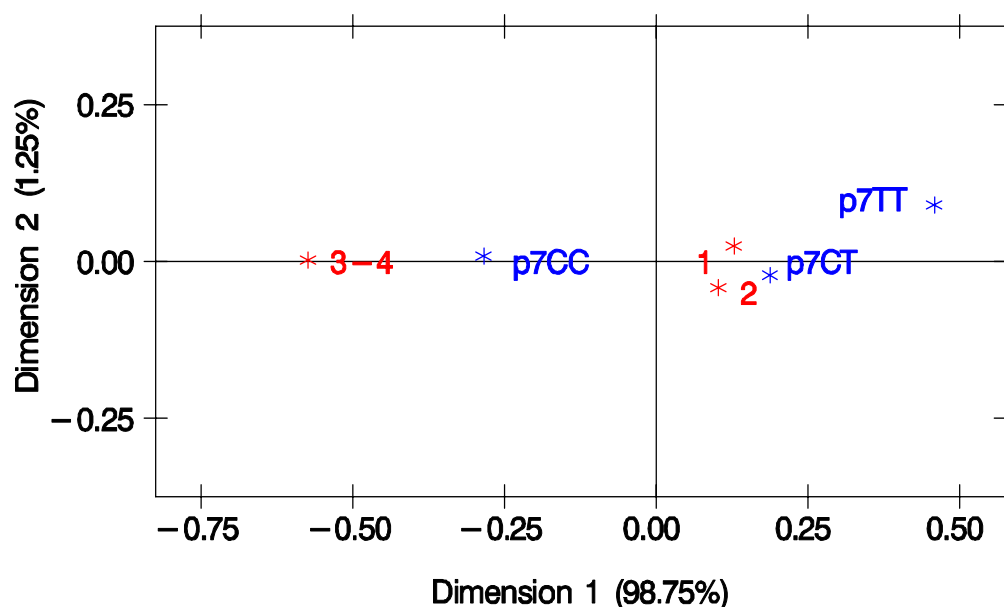


Figura 40. Correspondencia entre el polimorfismo PAK170CT y los 4 estadios

4- Análisis de correspondencia múltiples entre gen PAK y estadio.

El análisis de correspondencia múltiples muestra para el gen PAK nos fuerza a estudiar gran parte de las dimensiones debido a la ausencia de dependencia entre las variables, mostrado por la inercia que queda explicada por cada una de las dimensiones. Necesitamos de cuatro dimensiones para explicar algo más del 80%. Aún así, podemos observar como los estadios 2, 3 y 4 son atraídos, en líneas generales, por los genes homocigóticos y el estadio 1, en cambio, es atraído por los genes heterocigóticos. Dentro de la atracción homocigótica y los estadios, existe una separación marcada entre el estadio 2 y los estadios 3 y 4. Cada uno de estos estadios conforma unos grupos de genes homocigóticos. Estadio 2 atraído por los genes 7TT, 3AA y 6TT, mientras que los estadios 3 y 4 son atraídos por los genes 7CC, 3GG y 6CC.

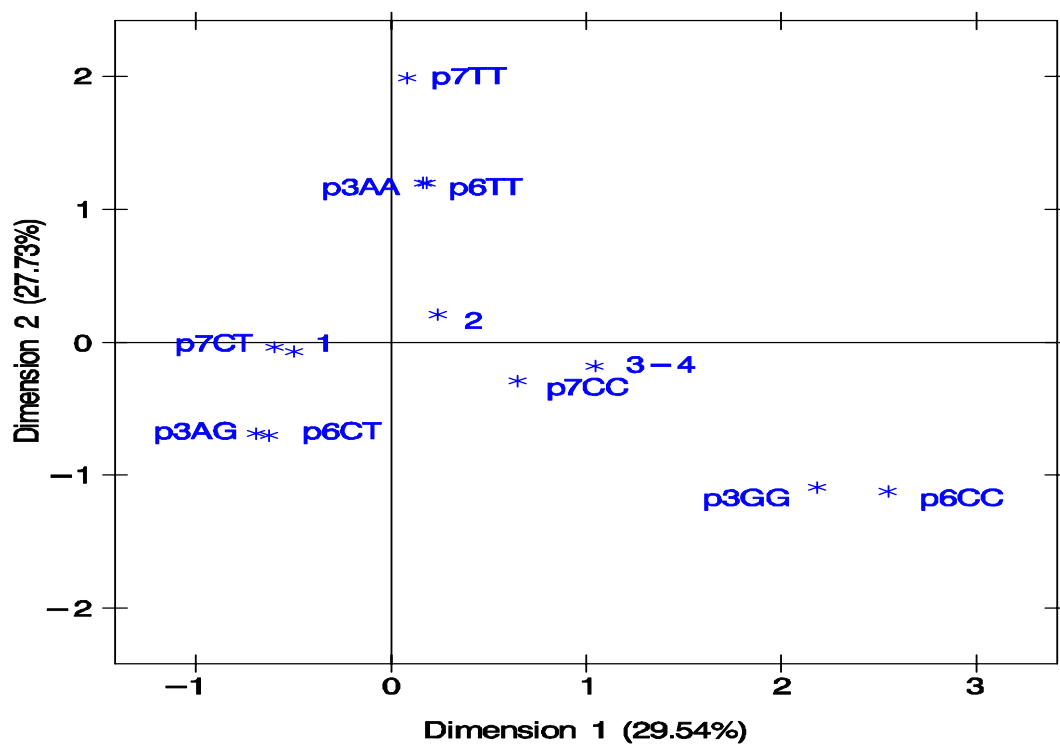


Figura 41. Correspondencia múltiple entre el gen PAK y los estadios en las dimensiones 1 y 2.

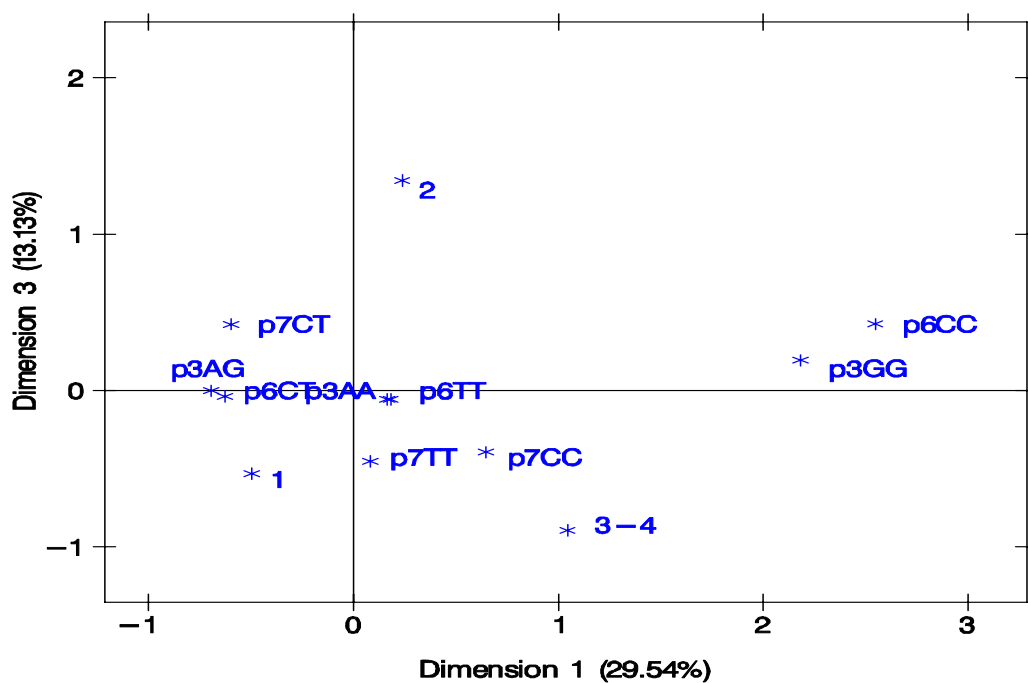


Figura 42. Correspondencia múltiple entre el gen PAK y los estadios en las dimensiones 1 y 3.

Conclusión de la relación gen y estadio

En conclusión, podemos decir que el rasgo principal de nuestros datos es la falta de asociación entre gen y estadio. Esta conclusión es reflejada tanto en el estudio bivariable de las tablas de contingencia a través del p-valor como en el análisis de correspondencia, en cuanto a la cantidad de inercia que es explicada por cada dimensión y la cantidad de dimensiones que debemos estudiar para explicar los comportamientos subyacentes entre las categorías. No obstante, la falta de asociación estadística en nuestros datos no imposibilita que existan preferencias entre la agrupación estadio-gen. Pretendemos, por tanto, extraer información de nuestros datos para señalar posibles atracciones y repulsiones entre categorías, para indicar futuros caminos de estudio. Las relaciones más relevantes a la vista de los datos son:

Gen EMSY:

- El estadio 2 es diferente al resto de los estadios debido a que presenta una relación favorable con los genes homocigóticos CC y GG.
- El estadio 1 atrae al gen TT, mientras que los estadios 3 y 4 lo repelen.

Según estos datos podríamos concluir que si aparece CC o GG es más probable que se relacione con pacientes en estadio 2. En el estadio 1, 3 y 4 la presencia de estos polimorfismos es similar excepto si aparece el polimorfismo TT que es atraído por el estadio 1.

Gen CAPN5:

- Conocido el estadio 1 se comporta de manera similar a la población general respecto al gen CAPN5. CAPN5 no aporta información al estadio 1.
- El estadio 2 suele ser atraído por la mayoría de los genes homocigóticos.

- Los estadios 3 y 4 se encuentran atraídos por los genes heterocigóticos y repelidos por los homocigóticos.

Gen PAK1:

- El estadio 1 es atraído por los genes heterocigóticos.
- Los estadios 2, 3 y 4 son atraídos por genes homocigóticos, separándose el estadio 2 de los estadios 3 y 4 según unos determinados genes. Estadio 2 es atraído por los genes homocigóticos TT, AA y CC. Los estadios 3 y 4 son atraídos por los genes GG y CC.

DISCUSIÓN

El cáncer de la glándula tiroides es el tumor endocrino más frecuente representando más del 90% de los cánceres endocrinos descritos en la literatura según estudios publicados previamente (Mc Conahey WV, 1986). Se puede diagnosticar a muy diferentes edades, aunque es más habitual que su diagnóstico se realice a partir de los 30 años (Kebebew, 2000), lo cual concuerda con los datos obtenidos de los pacientes de este estudio, cuyas edades estaban comprendidas entre 19-78 años (edad media 46,8 años). Lo mismo sucede respecto al sexo de los pacientes, observándose en nuestra serie 96 mujeres (88%) y 13 hombres (12%), datos concordantes con múltiples estudios previos donde se ha observado que el carcinoma de tiroides es más frecuente en el sexo femenino (Correa P. 1995).

La punción aspiración con aguja fina (PAAF) de nódulos tiroideos ha ganado una amplia aceptación como valioso método para distinguir los nódulos con citología sospechosa de neoformación maligna, y, por lo tanto, identificar pacientes que puedan requerir cirugía preferente respecto a otros que la citología obtiene “material coloide”.

En nuestro estudio los resultados obtenidos en la punción por PAAF ofrece diagnósticos de: “coloide benigno”, “atipia celular”, “variante de proliferación folicular”, “sospecha de malignidad” y “no diagnóstica”, que sigue las orientaciones publicadas por otros autores (Baloch ZW, 2008).

El 72.5% (n=79) de los pacientes con cáncer tiroideo mostró una citología sugerente de malignidad, de los cuales el 33.9% (37/109) fue la “proliferación folicular”, el 32,1% (35/109) fue “sospechoso de malignidad”, el 6.4% (7/109) fue “atipias celulares”, el 23.8% (26/109) fue “coloide benigno” y el 3.67% (4/109) fue “no diagnóstico”. Este estudio también plantea importantes cuestiones relativas a la clasificación actual de la PAAF de tiroides. El diagnóstico mediante PAAF proliferación folicular puede incluir tanto carcinomas papilares como foliculares, como variante folicular de células de Hürthle, por lo tanto, se debe intentar separar estos pacientes con características citológicas sospechosas, del carcinoma papilar. Por esta razón,

sería deseable obtener más diagnósticos citológicos con “sospecha de carcinoma papilar” ya que estos pacientes requerirán un tratamiento quirúrgico diferente, en comparación con otros pacientes con el diagnóstico de proliferación folicular.

Así, el diagnóstico histológico de los nódulos de tiroides extirpados que tenían PAAF con sospecha de neoplasia folicular incluye nódulos hiperplásicos/adenomatosos, adenoma folicular, carcinoma folicular, carcinoma papilar y variante folicular de carcinoma papilar. Ya se ha documentado la dificultad en el diagnóstico histológico de la variante folicular de carcinoma papilar de tiroides, debido a la inclusión de otras características diagnósticas tanto benignas como malignas (Mazzaferri, 1993). En esta categoría se incluyen la presencia de abundante coloide acuoso y la escasez de características nucleares de carcinoma papilar (alargamiento nuclear, elongación nuclear central, aclaramiento de la cromatina, y rarezas de las inclusiones nucleares) (Kung IT, 1990). Algunos casos de la variante folicular de carcinoma papilar de tiroides muestran una distribución multifocal más que difusa de las características nucleares de carcinoma papilar pudiendo semejar enfermedad hiperplásica benigna o adenoma folicular (Mazzaferri EL, 1993).

Para este estudio, algunos de los pacientes con las características citológicas mencionadas anteriormente se han etiquetados como “proliferación folicular con características sospechosas de malignidad del carcinoma papilar de tiroides”. El 72.5% de estos pacientes reveló un diagnóstico de una lesión sospechosa de malignidad en la PAAF. En un estudio del Servicio de Cirugía General y Digestivo “B” del Hospital Universitario 12 de Octubre, con una muestra de 500 pacientes, se obtuvieron resultados en los que un diagnóstico sospechoso se asocia con un nódulo maligno en un 20-40% de los pacientes. Chen et al (Chen H, 1995) informaron de un 54% de especificidad para el diagnóstico de sospecha de carcinoma papilar.

Con la presencia de un citopatólogo experimentado, la exactitud de un diagnóstico citológico con PAAF se aproxima un 95% (Leight GG, 1997). Usando esta técnica, el número de pacientes sometidos a tiroidectomía ha

disminuído en un 25%, mientras que el hallazgo de cáncer en las muestras extirpadas quirúrgicamente ha aumentado de 15% a, por lo menos, 30% gracias a la utilización de técnicas citológicas (Gharib H, 1991). El examen citológico de las lesiones foliculares por PAAF, sin embargo, tiene importantes limitaciones (Emerick GT, 1994). Los aspirados de las lesiones foliculares son muy celulares, con ausencia de coloide. Además, las lesiones foliculares tienen grandes núcleos con cromatina nuclear y grandes nucleolos.

Si bien la citología es una buena técnica para identificar neoplasias foliculares, es incapaz de diferenciar los carcinomas foliculares de los adenomas foliculares porque no puede demostrar la invasión capsular o vascular (Dwarakanathan AA, 1989). La utilización de los parámetros citológicos tales como: patrón celular, diámetro nuclear, el número y la marginación de nucleolo y el flujo citométrico (Grant CS, 1990) han servido para hacer un diagnóstico más exacto diferenciando los carcinomas de los adenomas foliculares.

Dado que la PAAF no puede distinguir adenoma y carcinoma folicular, la mayoría de las PAAF de neoplasias foliculares de tiroides se diagnostican como “proliferación folicular”. Por lo tanto, el empleo de la PAAF en estos casos para llegar a un diagnóstico definitivo tiene que contemplar necesariamente el tratamiento quirúrgico.

Varios estudios han tratado de evaluar la probabilidad de una lesión maligna por la combinación de parámetros clínicos con un resultado indeterminado de PAAF (Russell MA, 1975). Estos estudios nos ayudan, pero no demuestran una capacidad de predicción del potencial maligno empleando datos como el tamaño de la lesión y la edad de los pacientes; así con tumores mayores de 4cm y los pacientes mayores de 50 años de edad pueden predecir una más alta probabilidad de neoformación maligna. Otros estudios han abogado por realizar PAAF de repetición para eliminar el diagnóstico erróneo de lesiones benignas aunque su uso en la diferenciación benigna de éstas con las lesiones malignas foliculares sigue siendo pobre (Samaan NA, 1992).

El enfoque terapéutico estándar en un diagnóstico citológico de carcinoma papilar es el estudio histológico intraoperatorio de la pieza extirpada, realizando un tiroidectomía total o casi total con o sin vaciamiento ganglionar, dependiendo de las características del tumor y hallazgos intraoperatorios de diseminación ganglionar (Samaan NA, 1992). Además, si el nódulo sospechoso extirpado por lobectomía posteriormente es diagnosticado como carcinoma papilar de tiroides, puede ser necesario completar la cirugía en un segundo procedimiento quirúrgico que se lleva a cabo para realizar una tiroidectomía de totalización (Ozata M, 1994). Es por esta razón, que debido a la frecuencia de falsos negativos y a las biopsias intraoperatorias no concluyentes de malignidad, conlleva a que la cirugía en dos tiempos siga siendo una parte del tratamiento quirúrgico de estos pacientes.

El tratamiento quirúrgico de las neoplasias foliculares de la glándula tiroides todavía genera controversia. La mayoría de los pacientes que optan para la extirpación de una lesión folicular no tienen un claro diagnóstico de carcinoma. Como se mencionó anteriormente, la PAAF no es sensible para distinguir carcinoma de adenoma folicular y la dificultad en el manejo de estos pacientes gira entorno a que el diagnóstico de carcinoma folicular se suele obtener sólo después de estudiar múltiples secciones después de la lobectomía, y por tanto la PAAF resulta insuficiente para el diagnóstico de precisión.

Por lo tanto, en el momento de la operación, el cirujano puede tener que tomar una decisión sobre la extensión de la tiroidectomía. Algunos autores afirman que, la combinación de lobectomía con istmectomía sigue siendo un medio aceptable de tratamiento inicial para los pacientes que se consideran de bajo riesgo de carcinoma (Bassin HJ, 1994). Incluido en este grupo de bajo riesgo están los varones de menos de 40 años, las mujeres de menos de 50 años de edad, las lesiones de menos de 4 cm de diámetro (Baloch ZW, 2008). Estos pacientes tienen un mejor pronóstico y rara vez fallecen por recurrencia o metástasis del cáncer de tiroides.

Por el contrario, otros autores han recomendado una extirpación más completa de todo o casi todo el tejido tiroideo de cualquier paciente con diagnóstico o sospecha de carcinoma folicular. Varios estudios retrospectivos han llegado a la conclusión de que incluso en grupos de bajo riesgo, una operación más amplia produjo una disminución en las tasas de recidiva local y la mejora de la supervivencia global (Basolo F, 1999). La eliminación total de tejido tiroideo también tiene varias ventajas adicionales. En primer lugar, con la eliminación de todo o casi todo el tejido tiroideo, la tiroglobulina puede utilizarse como un marcador tumoral en pacientes a seguir para la enfermedad recurrente (Lang B, 2007). Además, la eficacia de la exploración y ablación del tejido tiroideo normal o metastásico con yodo-¹³¹ es mayor después de la tiroidectomía total. Estas ventajas deben sopesarse con respecto a las posibles complicaciones de la tiroidectomía total.

Existe controversia en la actualidad sobre el uso habitual de congelación en las muestras histológicas remitidas para biopsia intraoperatoria, alegando que proporciona una ayuda mínima en la posibilidad de distinguir el adenoma del carcinoma (AACE, 2006). Por eso, muchos cirujanos, abogan por la exéresis completa de la glándula para las lesiones foliculares en los pacientes con un alto riesgo (> 4cm, edad > 50 años) para tumores malignos, sea cual sea el resultado de la sección congelada. En el Servicio de Cirugía General y Digestivo “B” del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, donde se ha realizado este estudio, se han obtenido beneficios en el estudio de las muestras histológicas por congelación, ayudando en la toma de decisiones intraoperatorias. Su enfoque en los tumores foliculares, una vez que han sido seleccionados los pacientes con neoplasias foliculares para la cirugía, es inicialmente realizar una hemitiroidectomía (lobectomía más istmectomía) y enviar la pieza para estudio intraoperatorio. Los resultados obtenidos de la sección congelada, no sólo servirían para confirmar el diagnóstico de la proliferación folicular, sino que también permitiría valorar datos de infiltración capsular y datos de malignidad que ampliasen la magnitud de la tiroidectomía. Si la sección congelada sugiere que la lesión es un adenoma benigno y el paciente es considerado de bajo riesgo, la operación se finaliza entonces y queda la toma final de decisiones condicionada al estudio completo de la pieza

tras su inclusión en parafina. Los pacientes con tumores pequeños y que muestran pequeñas áreas de invasión capsular o invasión microvascular en el estudio histológico definitivo, tienen un mejor pronóstico y, en estos casos muy seleccionados, podría contemplarse una cirugía menos agresiva (lobectomía más istmectomía). En estos casos y en estudios con pacientes seleccionados se ha observado que no hay diferencia en la supervivencia en relación con la extensión de la tiroidectomía, con menos de un 10% de recurrencia locorregional (AACE, 2006). Por el contrario, cuando existe marcada invasión capsular o invasión vascular, entonces una tiroidectomía total debe llevarse a cabo. Esto ayudará a maximizar el control local y facilitar el seguimiento a largo plazo.

En unidades de referencia en el tratamiento quirúrgico en patología de tiroides y en el Servicio de Cirugía General y Digestivo “B” del Hospital Universitario 12 de Octubre con el que se ha realizado este estudio, se considera que, en términos de un mejor control local, la mejora de la supervivencia en determinados grupos y la facilidad de seguimiento a largo plazo, el beneficio de una operación de tiroidectomía total para el carcinoma folicular supera el riesgo de complicaciones inherentes a este tipo de cirugía (parálisis recurrencial e hipoparatiroidismo permanente).

Si la biopsia intraoperatoria es diagnóstica de carcinoma papilar de tiroides, por regla general se ha realizado una tiroidectomía total o casi total. Este diagnóstico histológico intraoperatorio demuestra la importancia del mismo para evitar cirugías en dos tiempos (Bronner MP, 1988). Otros autores han demostrado la utilidad de otras técnicas de estudio intraoperatorio (técnicas de raspado ultrarrápido con tinción de Papanicolau) con un 98% de correlación entre el diagnóstico intraoperatorio y el diagnóstico final de malignidad (Basolo F, 1999). En nuestro estudio, la biopsia intraoperatoria se realizó en 18 pacientes (16.5%), y en 5 de ellos hubo un diagnóstico inequívoco de carcinoma papilar de tiroides. Como la experiencia de los patólogos mejora en el reconocimiento de las características nucleares de una preparación teñida con tinción de Papanicolau, se observa paralelamente un aumento del número

de pacientes de diagnóstico definitivo de carcinoma papilar realizados en esa evaluación intraoperatoria.

En los 109 pacientes del estudio, la técnica quirúrgica más realizada fue la tiroidectomía total (90 pacientes), seguido de hemitiroidectomía derecha, tiroidectomía “casi total” y hemitiroidectomía izquierda con 8, 7 y 4 pacientes respectivamente; todo ello comparado con los resultados anatomopatológicos, concuerda con lo ya comentado y expresado previamente en este trabajo. De todas las intervenciones quirúrgicas realizadas, en 91 ocasiones se realizaron en 1 sólo acto quirúrgico.

En algunos estudios se ha postulado que la cirugía más extensa de tiroides pudiese mejorar el pronóstico en pacientes con enfermedad en estadio III (Gharib H, 1994) (Emerick GT, 1994), aunque deben evaluarse los riesgos y beneficios de una tiroidectomía total al decidir el tratamiento adecuado. Los procedimientos alternativos para la cirugía de los ganglios linfáticos, no difieren significativamente en sus efectos sobre la supervivencia, aunque su correcta realización, cuando está indicada, sí condiciona una disminución significativa en el control locorregional de la enfermedad, con disminución de recidivas locales que, en ocasiones, pueden implicar nuevas reintervenciones cervicales con la subsiguiente morbilidad asociada. Aunque escapa al objetivo de este trabajo, sí debo comentar que las disecciones ganglionares de cuello en esta serie de pacientes, se realizó siempre de forma terapéutica y nunca profilácticamente; en el seguimiento de los pacientes a largo plazo no se han observado recidivas locales en el cuello, tanto en pacientes con disecciones ganglionares del compartimento central y laterocervicales de los compartimentos II, III, IV y V (excepcionalmente se precisó la disección del compartimento I), como en los que no se indicó dicha técnica.

Una nueva realidad de la medicina moderna se basa en conocer los genes y proteínas que controlan el comportamiento de las células, qué hacen y los cambios que surgen cuando se padece una patología.

Se investiga intensamente sobre las alteraciones que existen en el genoma y epigenoma relacionadas con ciertas enfermedades y si estas alteraciones se comportan como factor predisponente de enfermedad o, por el contrario, si estas alteraciones genéticas actúan como factor protector de padecer la enfermedad (Livingston DM, 2004). Así, el genoma de los pacientes nos aporta información que permitiría a los médicos tomar decisiones clínicas con más precisión; sin embargo, hasta ahora no existe un consenso para el uso de las herramientas bioinformáticas en la práctica clínica.

Ampliando toda esta información genética, se pueden plantear alternativas de tratamiento y dar consejo genético para poder tomar decisiones de diagnóstico, tratamiento y pronóstico (Livingston DM, 2004). Los principales obstáculos son, por un lado, las limitaciones de los recursos de los que disponen los centros para poner a disposición de los especialistas este tipo de herramientas, pero quizá lo más importante es que falta formación por parte de los profesionales tanto para realizar las pruebas como para la interpretación biológica de la información.

Actualmente, la mayoría de los estudios que utilizan la información del genoma humano son descriptivos y sugieren marcadores diagnósticos o pronósticos, además de asociar algunas mutaciones con predisposición para desarrollar alguna enfermedad o con la respuesta que se obtendrá a un determinado fármaco. El próximo paso es diseñar estudios prospectivos para poder confirmar estos datos y trasladarlos a la práctica clínica.

Aunque el progreso de las técnicas complementarias de diagnóstico es incesante (Pielberg G, 2003), aún hoy es relativamente compleja la priorización de la patología tiroidea en los servicios de cirugía general debido, en gran medida, a la ausencia de un diagnóstico histológico definitivo hasta que se efectúa la correspondiente intervención quirúrgica y se remite la pieza extirpada para su análisis anatomopatológico definitivo.

La patología quirúrgica benigna tiroidea, por ello, satura sobremanera las listas de espera de los Servicios de Cirugía no pudiéndose seleccionar con precisión los pacientes mas acuciantes que requieren un tratamiento quirúrgico precoz entre aquellos cuyo tratamiento puede diferirse sin riesgo para el paciente. En concreto, nos referimos a la posibilidad todavía hoy lejana de seleccionar a los pacientes para cirugía precoz en base a sus peculiaridades genéticas que indiquen un alto riesgo de padecer una patología tiroidea maligna.

El abordaje genómico se está aplicando con éxito en múltiples disciplinas ya que permite identificar los factores genéticos que predisponen a las enfermedades complejas tales como la diabetes, el cáncer, la enfermedad cerebro vascular, las demencias o las enfermedades psiquiátricas (Lengauer C, 1998). Además, este método identifica las variaciones genéticas que modulan la respuesta de los individuos a la administración de fármacos (farmacogenómica) u otras terapias. Como resultado de todos estos estudios, se espera conocer qué genes están involucrados en cada patología y cuáles comprometen los posibles tratamientos en cada individuo. En base a este conocimiento se podrá efectuar un tratamiento óptimo y personalizado en cada paciente y cada caso, aumentando la eficacia de los mismos y minimizando la aparición de efectos indeseables durante la terapia.

Al identificar los factores genéticos que condicionan la aparición de las patologías tiroideas, en nuestro caso haciendo referencia especial a las de ámbito quirúrgico, podremos predecir una mayor o menor sospecha de malignidad de esas lesiones tiroideas en el estudio preoperatorio de las mismas, o el subtipo anatomopatológico que más probablemente va a padecer el paciente en estudio e incluso pronóstico a largo plazo de la lesión.

Si se hicieran estudios en población sana y se identificaran los marcadores relacionados con la aparición de ciertas patologías tiroideas, se podría dar consejo genético en un futuro y tomar decisiones en pacientes aún

sanos pero con predisposición de padecer patologías tiroideas malignas o benignas.

La variación genética es la base de la diversidad humana y desempeña un papel fundamental en las enfermedades. Es bien sabido que los tumores se desarrollan como resultado de la acumulación de alteraciones genéticas moleculares o genómicas, incluida la supresión, amplificación, traslocación, mutación y cambios epigenéticos (Kinzler KW, 2002). El análisis de los cambios genéticos moleculares históricamente ha conducido a la identificación de los oncogenes y genes supresores de tumores. Estudios de estas alteraciones son esenciales para comprender las bases moleculares del cáncer y para proporcionar marcadores diagnósticos y pronósticos potenciales y dianas terapéuticas para pacientes con cáncer (Onyango P, 2002).

Los métodos convencionales se han utilizado para revelar las alteraciones en el número de copias de ADN, incluyendo la hibridación genómica, cariotipo, citogenética convencional y otros. Estas técnicas son especialmente convenientes para la detección de grandes reordenamientos genómicos (>20Mb) (Shih IM, 2004). Los métodos de análisis de genotipo se han basado, durante más de 20 años, en polimorfismos de restricción de longitud de fragmentos ó SNP (single nucleotide polymorphisms) y marcadores de microsatélites. Los SNP están distribuidos en el genoma humano, con aproximadamente 1 polimorfismo por cada Kb (kilobite) (Hinds DA, 2005) y, como marcadores de microsatélites, los SNP son utilizados con frecuencia en los estudios de asociación, pruebas de genética clínica y/o determinación de la pérdida de heterocigosidad. Debido al gran número de polimorfismos en el genoma humano, son necesarios métodos de genotipado precisos, de alto rendimiento y de bajo coste (O'meara D, 2002).

Alternativamente, el análisis de microsatélites puede proporcionar evidencia de pérdida de heterocigosidad con mayor resolución en loci específicos, de mayor rendimiento y automatización. Por otra parte, los SNP ofrecen muchas ventajas para el análisis genético, incluyendo su prevalencia en la transmisión de la estabilidad del genoma, de mitosis y meiosis en

comparación con repeticiones cortas en tándem, y el hecho de que también son más fáciles de medir. Esta plataforma tecnológica ha sido utilizada para detectar pérdidas de heterocigosidad en diferentes patologías (Zhou X, Rao NP, 2005). Sin embargo, el alto coste de cada análisis, ha impedido que este enfoque sea más frecuente, en particular para los estudios con grandes series.

La secuenciación de ADN (Royo JL, 2006) ha cambiado notablemente la naturaleza de la investigación biomédica, identificando millones de polimorfismos a lo largo del genoma humano que ahora requiere mayor análisis para estudiar las bases genéticas de las enfermedades. Durante la última década, este gran número de SNP se ha anotado en bases de datos públicas y privadas. Debido a la enorme cantidad de información disponible, los métodos de genotipado de bajo coste se han ido desarrollando para proporcionar a las investigaciones la capacidad de leer la información del genoma (Hidalgo Pascual M, 2006).

Entre las posibles alteraciones genómicas, se encuentra la desmetilación (Hidalgo M, Galan J, 2008). Se ha propuesto que la desmetilación a lo largo del genoma afecta en gran parte a las regiones intergénicas e intrónicas de ADN, y se cree que derive en una inestabilidad cromosómica y en un aumento de mutaciones (Wilson AS, 2007). Otros eventos estructurales, como la amplificación de gen, también podrían explicar los diferentes niveles de expresión presentes en las biopsias de tumores y líneas de células tumorales.

Entre las plataformas de secuenciación de ADN disponibles, la pirosecuenciación se ha convertido en una herramienta útil para la determinación del genotipo de los polimorfismos (SNP) (Ronaghi M, 1998), la detección de mutaciones y el análisis de metilación de ADN. Su formato para genotipado permite tener resultados fiables a un coste razonable en pocos minutos (Royo JL, 2006).

Desde su primera publicación en 1998, la pirosecuenciación ha cambiado significativamente la genómica estructural (Ronaghi M, 1998). La pirosecuenciación es una técnica de secuenciación robusta y cuantitativa, en

tiempo real, basada en la detección de pirofosfato que se libera como consecuencia de la incorporación de nucleótidos en una secuencia de reacción de síntesis de ADN. Esta tecnología ha sido utilizada con éxito en grandes estudios de genotipado de SNPs y la detección de mutaciones (Van Goethem G, 2001).

La pirosecuenciación también puede ser utilizada para calcular las frecuencias alélicas en el “pool” de ADN (Lavebratt C, 2006), y ha sido extremadamente útil en la realización de ensayos de cuantificación alélica, analizando regiones con probable pérdida de heterocigosidad (LOH) (Pascual MH, 2006). Al comparar las muestras normales y tumorales, incluso pequeñas variaciones en la cantidad de alelo, pueden ser detectadas (García CA, 2000)

En este trabajo se ha realizado una selección de genes relacionados con la fisiología y patología tiroidea. Empleando marcadores intragénicos en estos genes y el análisis multilocus se ha pretendido identificar patrones genéticos específicos de cada una de las patologías en estudio. La consecución de patrones predictivos, aplicables al diagnóstico diferencial de la patología tiroidea, podría revolucionar el manejo clínico de los pacientes mediante racionalización y priorización de tratamientos.

Al evaluar el uso de la pirosecuenciación para determinar regiones con LOH (pérdida de heterocigosidad), se observa que LOH no se limitaba a un alelo específico, sin embargo, el tamaño limitado de la muestra (41 pacientes con cáncer papilar de tiroides) impide una comparación rigurosa. Por el contrario, no se encuentra ninguna evidencia de LOH entre biopsias de PTC (carcinoma papilar de tiroides). El presente método se basa en el hecho de que la pirosecuenciación es una técnica precisa, sensible y reproducible. Además, la alta densidad de polimorfismos a lo largo del genoma presenta una clara ventaja en comparación con estudios basados en microsatélites.

La alta informatividad de estos marcadores puede ser sustituida por una serie de polimorfismos con suficiente heterocigosidad en la población en estudio.

La hibridación genómica comparativa clásica proporcionó la posibilidad de detectar cambios en el número de copias cromosómicas en las muestras de células y tejidos, similar al cariotipo, sin necesidad de cultivo. Incluso el material en formalina o parafinado puede ser analizado. Sin embargo, las alternativas comerciales tienen muy limitada la resolución (aproximadamente 3 Mb) (Ylstra B, 2006).

El análisis de pérdida de heterocigosidad (LOH) basado en SNP ofrece una posibilidad para perfeccionar los puntos de interrupción correspondientes y excluir tales genes de la región crítica. Nuestros resultados muestran la viabilidad de la utilización de la pirosecuenciación utilizada para el estudio de LOH en el ADN aislados de los tejidos embebidos en parafina.

Como era de esperar, hemos encontrado pruebas que demuestran un desequilibrio alélico en aproximadamente un 16% de los marcadores informativos que se probó inicialmente. Estos datos concuerdan con estudios previos, entre manifestaciones de amplificación genómica que afectan al gen EMSY (Rodríguez C, 2004; King C, 2004), aunque no parecen significativos.

La detección de pérdida de heterocigosidad sería equívoca en presencia de cantidades sustanciales de ADN no tumoral de células normales. Por lo tanto, el grado de infiltración de los tejidos no patológicos dará una amplia gama de relaciones alélicas que se pueden detectar con un enfoque fiable y cuantitativo. Los resultados muestran la viabilidad de utilizar la pirosecuenciación para el estudio de pérdida de heterocigosidad en el ADN aislado de los tejidos parafinados. Este estudio tiene muchas ventajas, ya que no parece verse afectado por muchos problemas inherentes a otras patologías, como los marcadores de baja densidad o plataformas costosas.

Según los resultados de este estudio, la región que comprende los genes EMSY, CAPN5, PAK1 no está en desajuste alélico en el carcinoma papilar de tiroides. Estudios previos han informado que la región cromosómica 11q13.5-q14 expone muy altas tasas de desajuste alélico en una gran variedad de

tumores humanos, incluyendo de mama y cáncer de ovario, el carcinoma de cabeza y cuello, vejiga, etc, y que estos cambios genéticos se asociaron con una disminución de la supervivencia y la progresión tumoral. (Gollin SM, 2001)

Se han dirigido considerables esfuerzos hacia la identificación de posibles oncogenes en esta región y los 2 principales genes candidatos hasta la fecha son EMSY y PAK1. Para identificar el papel de esta región en el cáncer papilar de tiroides decidimos mapear la megabase que comprende tres genes: EMSY, CAPN5, y PAK1 (Hidalgo M, 2006). Este es el primer estudio con resultados sobre el desajuste alélico de estos genes en cualquier cáncer de tiroides (Hidalgo M, 2008).

La principal conclusión del estudio es la **falta de desajuste alélico en los loci de EMSY, CAPN5, y en PAK1 de los carcinomas papilares tiroideos de individuos heterocigotos para uno o más polimorfismos en estos genes.** A pesar de que el marcador utilizado en nuestro estudio posee una alta densidad lo cual aumenta la probabilidad de encontrar alguna anomalía cromosómica, no podemos excluir, sobre la base de nuestra serie, que un desajuste alélico en estos tres genes puede ser un factor asociado con PTC en un pequeño subgrupo de pacientes.

Los resultados presentados aquí son coherentes con la infrecuente aparición de pérdida alélica en PTC estudiada anteriormente por otros, lo que sugiere que la inestabilidad cromosómica no podía ser una característica importante de los tumores papilares, lo cual se correlaciona bien con un pronóstico favorable. (Wreesman VB 2002).

Sin embargo, otros investigadores han encontrado desajuste alélico en la región cromosómica 11q.13 en los adenomas foliculares, lo que podría indicar que esta localización pueda albergar otros genes implicados en la progresión hacia un fenotipo folicular. (Matsuo K, 1991)

Vale la pena mencionar que una limitación importante de la tecnología utilizada en el estudio es la posible presencia de reordenamientos subclonales dentro de la masa tumoral que llevan a la heterogeneidad (Zhu Z, 2006). No obstante, este límite es superado por los resultados negativos del estudio.

La ausencia de desajuste alélico en esta región sugiere que los genes EMSY, CAPN5, y PAK1 no están involucrados en la patogénesis de carcinoma papilar de tiroides.

Sin embargo, puede ser que sólo mutaciones o efectos epigenéticos pudieran existir en estos genes, o bien que sufren reordenamientos a un nivel que no es detectable por nuestra técnica (Hidalgo M, 2008).

El diseño del estudio de casos-control se adecua perfectamente a la identificación de genes que es probable que subyace en enfermedades comunes y complejas como el cáncer. Así, se seleccionaron un conjunto de tres haplotipos en los SNP etiquetados en cada uno de los genes EMSY, CAPN5, y PAK1 que sirven como marcadores para detectar asociaciones entre esta región y nuestra serie. Para aumentar el poder de detectar pequeños riesgos relativos, se limitó nuestra atención a SNP comunes (frecuencia > 0,31).

Construimos los haplotipos teniendo en cuenta las diferentes combinaciones de los tres SNP dentro de cada gen. No se encontró asociación alguna entre los genotipos de CAPN5 y PAK1 o haplotipos asociados y el riesgo de cáncer de tiroides en nuestra población. Podríamos no haber podido observar una verdadera asociación a causa de un Error estadístico de tipo II, debido al pequeño tamaño de la muestra.

Por esta razón, para los nuevos estudios de asociación será necesaria una serie mayor para obtener resultados independientes. Sin embargo, si existe riesgo alélico en PAK1 o CAPN5, su tamaño/efecto sería bajo.

Recientemente, se ha informado de que podría participar EMSY en el bajo nivel de susceptibilidad de cáncer de mama y de ovario (Livingston DM, 2004). Sin embargo, hace muy poco Benusiglio et al informaron que no hubo asociación entre variación genética común en EMSY y el riesgo de cáncer de mama o cáncer de ovario en dos grandes conjuntos de mujeres blancas británicas (Benusiglio PR, 2005). Curiosamente, cuando para este trabajo se ha analizado la distribución del haplotipo EMSY entre los pacientes con PTC en comparación con los casos control, se encontró una variación entre la población que tenía cáncer papilar de tiroides.

Este hallazgo proporciona las pruebas preliminares que un determinado haplotipo del gen EMSY podría conferir susceptibilidad a cáncer papilar de tiroides entre la población española.

A través de una comparación de las frecuencias de haplotipos entre los casos y controles, el haplotipo 111 parece estar sobre-representado entre pacientes con PTC y este resultado se confirma mediante una prueba de permutación. Utilizando el análisis de permutación, “**regressionbased model**”, se puede disminuir el error tipo I debido al pequeño tamaño de la muestra. En cualquier caso, estos resultados deben ser tratados con precaución, y para determinar con precisión la función del gen EMSY en la susceptibilidad de PTC, los nuevos estudios moleculares deberían ser realizados con una serie cuyo tamaño muestral sea de un mayor número para un estudio caso-control.

Llegamos a la conclusión de que los resultados obtenidos a partir de estos estudios no apoyan hallazgos de desajuste alélico en la cartografía de genes EMSY, CAPN5, PAK1 de la región 11q13.5-q14, al menos en el cáncer de tiroides. El estudio de asociación genética sostiene que no hay asociación entre los polimorfismos CAPN5 y PAK1 y la susceptibilidad de PTC.

Por último, existe evidencia de asociación entre el haplotipo 111 del gen EMSY y el carcinoma papilar de tiroides, ya que este haplotipo está

excesivamente representado entre estos pacientes, lo que sugiere que el gen EMSY podría ser de relevancia en la patogénesis del carcinoma papilar de tiroides, aunque sería necesaria una serie grande en un estudio de caso-control para corroborar estos hallazgos.

Al no obtener resultados positivos sobre el desajuste alélico con el estudio estadístico inicial, se decide ampliar el estudio estadístico mediante la exploración de datos de atracción y repulsión entre genes y estadio, para intentar obtener relaciones que pudieran ser nuevos caminos para futuros estudios. Así observamos que en el análisis de correspondencia simple de cada polimorfismo del gen EMSY y el estadio, no hay asociación estadísticamente significativa; esto mismo sucede con los tres polimorfismos del gen CAPN5 y del gen PAK. Aunque se ha realizado este segundo análisis con los datos obtenidos estadísticamente, también se ha concluido en la existencia de una falta de asociación entre gen y estadio.

CONCLUSIONES

- 1) La punción aspiración con aguja fina (PAAF) es un método diagnóstico muy válido en patología de tiroides, aunque con pobres resultados para el diagnóstico de certeza de ciertos tipos de carcinoma diferenciado tiroideo.
- 2) Como técnica quirúrgica más adecuada, la tiroidectomía total es el procedimiento de elección en la mayor parte de los pacientes con carcinoma papilar de tiroides y con la que se obtienen mejores resultados a medio y largo plazo.
- 3) Se ha conseguido optimizar el protocolo de extracción de ADN a partir de tejido incluido en parafina tanto en cantidad como en calidad del ADN.
- 4) La pirosecuenciación es un método válido y eficaz para analizar la cuantificación alélica y el estudio de pérdidas de heterocigosidad (LOH).
- 5) Se han analizado 9 marcadores en todos los tejidos: 3 marcadores para el gen EMSY, 3 para el gen CAPN5 y 3 para el gen PAK1. Los análisis de LOH han revelado que no hay una pérdida de heterocigosidad en los marcadores seleccionados, indicando que no se observa una alteración en la dosis génica en individuos afectados de carcinoma papilar de tiroides.
- 6) La región 11q13q-14 del cromosoma donde se encuentran los genes EMSY, CAPN5 y PAK1 no sufre desequilibrio alélico en los pacientes con cáncer papilar de tiroides.
- 7) No obstante la conclusión anterior, hemos observado que el haplotipo 111 del gen EMSY está excesivamente representado entre los pacientes con cáncer papilar de tiroides en relación con el grupo control, lo que

sugiere que el gen EMSY puede tener relevancia en la etiología del carcinoma papilar de tiroides.

- 8) No se ha demostrado asociación entre los genes EMSY, CAPN5 y PAK, y el estadio tumoral en pacientes con carcinoma papilar de tiroides.
- 9) Se han observado bloques con altos niveles de homocigosidad que llegan incluso a abarcar los 3 genes. La homocigosidad puede ser considerada como potencial factor de riesgo en cáncer.
- 10) La significación clínica y biológica de tal homocigosidad necesita ser investigada detalladamente en la población general.
- 11) La confirmación de estos resultados implicaría la demostración por vez 1ª que esta región puede ser una zona que sufre gran cantidad de rearrreglos o recombinación en procesos tumorales y por tanto que puede tratarse de una región implicada en la susceptibilidad a padecer patología tumoral de tiroides.

BIBLIOGRAFÍA

Acero J, Scola B. Tumores de Cabeza y Cuello. En: Guías de diagnóstico y tratamiento de los tumores malignos. Comisión de Tumores Hospital Gregorio Marañón. Ed. Comunidad de Madrid 2000

Adam L, Vadlamudi R, Kondapaka S, Chernoff J, Mendelsohn J, Kumar R. Heregulin regulates cytoskeletal reorganization and cell migration through the p21-activated kinase-1 via phosphatidylinositol-3 kinase. *J Biol Chem*; 273:28238-46. 1998.

Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, Biddinger PW, Nikiforov YE. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 30(2): 216-22;Feb 2006.

Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, Sterky F, Nyren O, Uhlen M, et al. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem*; 280:103-10. 2000.

Ain KB. Papillary thyroid carcinoma. Etiology, assessment, and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am*; 24(4): 771-760. 1995.

Akervall J, Jin Y, Wennerberg JP et al. Chromosomal abnormalities involving 11q13 in human are associated with poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*;76:853-9.1995.

Aldinger KA, Sman NA, Ibanez M, Hills CS. Anaplastic carcinoma of the thyroid: a review of 84 cases of spindle and giant cell carcinoma of the thyroid. *Cancer*; 41(6): 2267-2675. 1978.

Alfredo Fusco, Giuseppe Viglietto, Massimo Santoro. A new mechanism of BRAF activation in human thyroid carcinomas. *J Clin Invest*; 115(1):20-23. January 2005.

Alsanea O, Clark OH. Familial thyroid cancer. *Curr Opin Oncol*; 13(1): 44-51; 2001

AACE: American Association of Clinical Endocrinologists and Associazione Medici Endocrinologi medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules. *Endocrinol Pract*, 12:63-102. 2006.

American Joint Committee on Cancer: Manual for Staging of Cancer. Philadelphia, JP. Lippincott & Co.,p.29, 1988.

Ampudia X, Puig M, Matías X, Soldevilla J, Piera J, de Leiva A. Linfoma del tiroides. *Cir Esp*; 40: 1151-1160; 1986.

Ashok RS. Controversies in the management of thyroid nodule. *Laryngoscope*; 110:183-192, 2000.

Balibrea Cantero JL. Tratado de cirugía. Madrid: Editorial Marban:1394-1406. 1994

Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, Rosai J, Merino MJ, Randolph G, Vielh Ph, DeMay RM, Sidawy MK, Frable WJ. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid fine-needle aspiration state of the science conference. *Diagnostic Cytopathology* 36(6):425-437. 2008.

Bardet S, Malvilla E, Rame JP, Babin E, Samara G, De Raucourt D, Michels JJ, Reznik Y, Henry-Amar M. Macroscopic lymph-node involvement and neck dissection predict lymph-node recurrence in papillary throid carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 158(4):551-60. Apr 2008.

Baskin HJ: Effect of postoperative ¹³¹I treatment on thyroglobulin measurements in the follow-up of patients with throid cancer. *Thyroid*; 4:239-242. 1994.

Basolo F, Pollina L, Fontanini G, Fiore L, Pacini F, Baldanzi A. Apoptpsis and proliferation in thyroid carcinoma: correlation with bcl-2 and p53 protein expression. *Br J Cancer*; 75(4): 537-541. 1997.

Basolo F, Baloch ZW, Baldanzi A, Micoli P, LiVolsi VA. Usefulness of Ultrafast Papanicolau-stained Scarpe preparations in intraopeartive Management of thyroid lesions. *Mod Pathol*; 12: 653-657. 1999

Benusiglio PR, Lesueur F, Luccarini C, et al. Common variation in EMSY and risk of breast and ovarian cancer: a case-control study using HapMap tagging SNPs. *BMC Cancer*;5:81; 2005.

Block M.A., Miller J.M., Horn R.C. Thyroid carcinoma with cervical lymph node metastasis. Effectiveness of total thyroidectomy and node dissection. *Am. J. Surg.* 122:458-461, 1971

Bronner Mp, LiVolsi VA. Oxyphilic (Askanazy/Hurthle cell) tumors of the thyroid: Microscopic features predict biologic behaviour. *Surg Pathol*, 1:137-149. 1988.

Bubenhof R, Hedinger Ch R. Schilddrüsenmalignome vor und nach einföhrung der jodsalzprophylaxe. *Schweiz Med Wochenschr*; 107(21): 733-741. 1977.

Burch H. Evaluation and management of the solid thyroid nodule. *Endocrinol Metab Clin North Am*; 24:663-669, 1995.

Burman KD, Ringel MD, Wartofsky L. Unusual types of thyroid neoplasms. *Endocrinol Metab Clin North Am*; 25(1): 49-68. 1996.

Burke JS, Butler JJ, Fuller LM. Malignant lymphomas of the thyroid: a clinical pathologic study of 35 patients including ultrastructural observations. *Cancer*; 39(4): 1587-1602. 1977.

Brunt LM, Wells SA. Advances in the diagnosis and treatment of medullary thyroid carcinoma. *Surg Clin North A*; 67(2): 263-279. 1987.

Brian Hung-Hin Lang, MBBS, MS, FRACS, Chung-Yau Lo, MS, FRCS, Chan, MBBS, FRCS, King-Yin Lam, MD, FRCPA, Koon.Yat Wan. Staging Systems for Papillary Thyroid Carcinoma. A review and Comparison. *Ann Surg*; 245(3):366-378. March 2007.

Brzezianska E, Karbownik M, Migdalska-Sek M, Pastuszek-Lewandoska D, Wloch J, Lewinski A. Molecular annlysis of the RET and NTRK1 gene rearrangements in papillary thyroid carcinoma in the Polish population. *Mutat Res.* 2006 Jul 25; 599(1-2): 26-35. Epub Feb 17 2006.

Canto MT, Chu KC. Annual cancer incidence rates for Hispanics in the United States. *Surveillance, epidemiology and end results. Cancer*; 88(11): 2642-2651. 1992-1996.

Carniti C, Perego C, Mondellini P, et al. PP1 inhibitor induces degradation of RETMEN2A and RETMEN2B oncoproteins through proteosomal targeting. *Cancer Res*; 63(9): 2234-43. 2003.

Carragher NO, Fincham VJ, Riley D, Frame MC. Cleavage of focal adhesion kinase by different proteases during SRC-regulated transformation and apoptosis. Distinct roles for calpain and caspases. *J Biol Chem*, 276:4270-5. 2001.

Castro MR, Gharib H. Thyroid fine-needle aspiration biopsy: progress, practice and pitfalls. *Endocr Pract*; 9(2): 128-36. 2003.

Castro P, Roque L, Magalhaes J, Sobrinho-Simoes M. a subset of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma harbors the PAX8-PPARgamma translocation. *Int J Surg Pathol*; 13(3): 235-8. Jul 2005.

Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Gandhi M, Zhu Z, Nikiforova MN, Rabes HM, Fagin JA, Nikiforov YE. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest*. 115(1):94-101. Jan 2005.

Cerdá J, Rodríguez A, Molina E et al. Tumores tiroideos en niños. *Cir Pediatr*; 12(2): 65-70. 1999.

Chen H, Nicol TL, Udelsman R: Follicular lesions of the thyroid. Does frozen section evaluation alter operative management? *Ann Surg* 222:101-106; 1995.

Christensen SB, Ljungberg O, Tibblin S. Thyroid carcinoma in Malmö, 1960-1977. Epidemiologic, clinical and prognostic findings in a defined urban population. *Cancer*; 53(7): 1625-1633. 1984.

Cohen Y, Rodenbaum E, Clark DP, et al. Mutational análisis of BRAF in fine needle aspiration biopsias of the thyroid: a potencial application for the preoperative assesment of thyroid nodules. *Clin Cancer Res*;10:2761-5. 2004.

Conolly A, Mc Kenzie K. Pediatric neck masses: a diagnostic dilemma. *J Laryngol Otol*; 111:1541-545, 1997.

Cooper CS, Foster CS. Concepts of epigenetic in prostate cancer development. *Brithish Journal of Cancer* 100, 240-245. 2009.

Corpet A, Almouzni G. Making copies of chromatin: the challenge of nucleosomal organization and epigenetic information. *Trends Cell Biol*; 19(1):29-41. Jan 2009.

Correa P, Chen VW. Endocrine Gland cancer. *Cancer*;75(1): 338-352. 1995.

Czech JM, Lichtor TR, Carney JA, Van Heerden JA. Neoplasm metastatic to the thyroid gland. *Surg Gynecol Obstet*; 155:203-8. 1992.

David E, Rosen IB, Bain J, James J. Management of the hot thyroid nodule. *Am J Surg*; 170:481-483, 1995.

Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States. *JAMA* 2006; 295:2164-2167. 1973-2002.

De Castro del Pozo. *Manual de Patología General* . 5ª ed. 1995

De Diego G, Jara A. Relaciones entre el bocio endémico y el cáncer de tiroides. *Rev Clin Esp*; 181:378-382. 1987.

De Groot LJ, Reilly M, Pinnameneni K, Refetoff S. Retrospective and prospective study od radiation-induced thyroid disease. *Am J Med*; 74(5): 852-862. 1983.

De la Torre V, Pérez A, García-Ameijeiras A. Carcinoma medular de tiroides: Formas de presentación, diagnóstico precoz y conducta a seguir. *Endocrinología*; 73:152-7. 1988.

Dedo, H H: The Paralysed larynx: An electromyography study in dogs and humans. *Laryngoscope*, 80: 1455-1517. 1970.

Deftos LF. Radioimmunoassay for calcitonin in medullary thyroid carcinoma. JAMA; 227(4): 403-406. 1974.

Deladoëy J, Vassart G, Van Vliet G. Possible non-Mendelian mechanisms of thyroid dysgenesis. Endocrin Dev; 10:29-42. 2007.

Derringer GA, Thompson LD, Frommelt RA, Bijward KE, Heffess CS, Abbondazo SL. Malignant lymphoma of the thyroid gland: a clinicopathologic study of 108 cases. Am J Surg Pathol; 24(5): 623-39. 2000.

Desault, PJ: Giraud, Jour. De Chir de Paris, iii, 3, 1792

Di Cristoforo J, Silvy M, Lanteaume A, Marcy M, Carayon P, De Micco C. Expresión of tpo mRNA in thyroid tumors: quantitative PCR analysis and correlation with alteration of RET, BRAF, RAS and PAX8 genes. Endocr Relat Cancer. 13(2): 485-95. Jun 2006.

Dickson C, Fantl V, Gillett C, et al. Amplification of chromosome band 11q13 and a role for cyclin D1 in human breast cancer. Cancer Lett, 90:43-50. 1995.

Díez JJ. Nódulo tiroideo solitario: valoración clínica, diagnóstico y tratamiento. At Prim; 13:499-504, 1994.

Dottorini ME, Vignati A, Mazzucchelli L, et al. Differentiated thyroid carcinoma in children and adolescents: a 37-year experience in 85 patients. J Nucl Med; 38:669-675. 1997

Dralle H, Brauckhoff M, Machens A, Gimm O. Surgical management of advanced thyroid cancer invading the aerodigestive tract. En: Clark OH, Duh QY, Kebebew E, editores. Textbook of Endocrine Surgery. 2.a ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; p. 318-33. 2005.

Duh QY, Grossman RF. Thyroid growth factors, signal transduction pathways and oncogenes. Surg Clin North Am; 75(3): 421-437. 1995.

Dunhill T P, Thomas Peel Dunhill: pioneer thyroid surgeon. Vellar ID. Aust N Z J Surg; 69(5):375-387. 1999.

- Dunn JM, Farndon JR. Medullary thyroid carcinoma. *Br J Surg*; 80(1): 6-9. 1993.
- Dwarakanathan AA, Ryan WG, Staren ED, et al: Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid. Diagnostic accuracy when performing a moderate number of such procedures. *Arch Intern Med*;149:2007-2009. 1989.
- Emerick G.T.,Duh Q.Y.,Siperstein A.E.,Burrow G.N.,Clark O.H. Diagnosis,treatment and outcome of follicular thyroid carcinoma. *Cancer* 3287-3295, 1993.
- Eng C. PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat*; 22(3):183-98. 2003.
- Erdogan M, Berdeli A, Karadeniz M, Ertan Y, Cetinkalp S, Saygili F, Tuncyurek M, Yilmaz C, Tuzun M, Kabalak T, Uluer H, Ozgen AG. The Prevalence pf RET/PTC Mutations in Papillary Thyroid Cancers in Turkish Populations and its Relation Between Tumor Histopathology and Prognostic Factors. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*.116(4):225-230. Apr 2008.
- Ezzat S, Sarti DA, Cain DR, et al. Thyroid incidentalomas: Prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med*;154:1838-1840. 1994.
- Fagin JA. How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. *J Endocrinol*; 183(2): 249-56. 2004.
- Fahey TJ, Reeve TS, Delbridge L. Increasing incidence and changing presentation of thyroid cancer over a 30-years period. *Br J Surg*; 82:518-520. 1995.
- Farid NR, Shi Y, Zou M. Molecular basis of thyroid tumors. *Endocr Rev*; 15(2):202-32. 1994.
- Favus MJ, Schneider AB, Stachura ME et al. Thyroid cancer occurring as a late consequence of head and neck irradiation. Evaluation of 1056 patients. *N Engl J Med*; 294(19): 1019-1025. 1976.
- Fernandez RM, Pecina A, Antinolo G et al. Análisis of RET polymorphisms and haplotypes in the context of sporadic medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*;16(4): 411-7. 2006.

Ferrero Herrero E, Guadarrama FJ, Hidalgo M. Cirugía del cáncer de Tiroides. Cirugía Andaluza. Vol 14(2):156. Jun 2003.

Ferrero Herrero E., Hidalgo Pascual M: Cirugía Tiroidea. Cirugía Andaluza Vol.14 (1), 5-6, 2003.

Ferrero Herrero E, Hidalgo M, Hijas E, Butrón T, Guadarrama F.J, Sánchez de Pedro F, Moreno N, Peláez P, Castillo M.J, Lomas M, Botella F: Valor de la disección ganglionar en pacientes con cáncer diferenciado de tiroides. Cirugía Andaluza Vol. 14 (1), 39-44, 2003

Ferrero E, Lopez. A, Calvo A, Lozano L, Guadarrama F.J, Benavides J, Castillo M.J, Carranza A.G, Hijas E, Botella F. Vaciamiento funcional modificado de cuello por cáncer tiroideo como alternativa a la disección radical clásica. Reunión Nacional del Colegio Internacional de Cirujanos. Tenerife. 1995

Fierro-Benítez R. Thyroid cancer, Quervain's thyroiditis and Hashimoto's disease in an endemic goiter Andean area, Acta Endocrinol Suppl (Copenh); 179:86-87. 1973

Fisch U.P., Sigel M.E. Cervical lymphatic system as visualized by lymphography. Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.73:869-871, 1964

Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. Proc Nat Acad Sci USA. 102: 10604-10609. 2005.

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 on histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nat Genet 37: 391-400. 2005.

Fragu P. Le regard de l'histoire des sciences sur la glande thyroïde (1800-1960). Annales d'Endocrinologie (Paris). 60,10-22. 1999

Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, Gangemi P, Attard M, Stella M, Loda M, Vella V, Giordano C, Trimarchi F, Masón E, Belfiore A, Vigneri R. BRAF (V600E) mutation

and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 15(1): 191-205. Mar 2008.

Fulvio Basolo, Riccardo Giannini, Carmen Monaco, Rosa Marina Carlomagno, Martina Pancrazi, Giuliana Salvatore, Gennaro Chiap, Rossella Elisei, Paolo Miccoli, Aldo Pinchera, Alfredo Fusco. Potent Mitogenicity of the RET/PTC3 Oncogene Correlation and Prevalence in Tall-Cell Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *Am J Pathol*. 160(1): 247-254. January; 2002.

Fuki Y, Yamakawa T, Taniki T et al: Sentinel Lymph node biopsy in patients with papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 92: 2868-2874. 2001.

Gaertner EM, Davidson M, Wenig BM. The columnar cell variant of thyroid papillary carcinoma. Case report and discussion of an unusually aggressive thyroid papillary carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 19(8):940-947. 1995.

Galanti MR, Sparen P, Karlsson A, Grimelius L, Ekbom A. Is residence in areas of endemic goiter a risk factor for thyroid cancer?. *Int J Cancer*;61(5): 615-621. 1995.

Galofré M. Cáncer de tiroides. *Med Clin (Barcelona)*; 61(7): 428.1973

García CA, Ahmadian A, Gharizadeh B, Lundeberg J, Ronaghi M, Nyren P. Mutation detection by pyrosequencing: sequencing of exons 5-8 of the p53 tumor supresor gene. *Gene*;253:249-57. 2000.

García-Poley A, Vázquez Gallego JM, Collantes Pérez J, Escobar Jiménez L, Gavilán Villarejo I, García Curiel A. Características anatomoclínicas y diagnósticas del carcinoma tiroideo. Estudio de 126 casos. *Rev Clin Esp*; 194(1): 3.8. 1994.

Gaudray P, Szepietowski P, Escot C, Birnbaum D, Theillet C. DNA amplification at 11q13 in human cancer. From complexity to plexity. *Mutat Res*, 276:317-28. 1992.

Gharib H: Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: advantages, limitations, and effect. *Mayo Clinic Proc*; 69:44-49. 1994.

Gharib H, Golener JR, Johnson DA. Fine-needle aspiration cytology of the thyroid. A 12-year experience with 11000 biopsies. *Clin Lab Med*; 13:699-709. 1991.

Gillenwater A.M., Goeppert H. Surgical management of laryngotracheal and esophageal involvement by locally advanced thyroid cancer. *Sem.Surg.Oncol.* 16:19-29, 1999.

Gilliland FD, Hunt WC, Morris M, et al. Prognostic factors for thyroid carcinoma: A population-based study of 15698 cases from the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) program, 1973-1991. *Cancer*; 79:564-573. 1997.

Gimm O, Brauckhoff M, Thanh PN, Sekulla C, Dralle H. An update on thyroid surgery. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 29 Suppl 2: S447-52. Epub 2002 Jul 11. Review. Aug 2002.

Gollin SM. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head Neck*, 23:238-53. 2001.

Goutas N, Vlachodimitropoulos D, Bouka M, Lazaris AC, Nasioulas G, Gazouli M. BRAF and K-RAS mutation in a Greek papillary and medullary thyroid carcinoma cohort. *Anticancer Res*; 28(1A):305-8. Jan-Feb, 2008.

Granado A, Granado JM, Lavalle JA, Redel J, Jaraba JL. Nódulo frío y cáncer de tiroides. *Med Clin (Barc)*; 65(1): 9-11. 1975.

Grant CS, Hay ID, Ryan JJ, et al: diagnostic and prognostic utility of flow cytometric DNA measurements in follicular thyroid tumors. *World J Surg*; 4:283-290. 1990.

Grauer A, Raue F, Gagel RF. Changing concepts in the management of hereditary and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Endocrinol Metab Clin North A*; 19(3):613-635. 1990.

Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, et al. PTC as a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell*, 60:557-63. 1990.

Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. *Genética moderna*. Ed McGraw-Hill-Interamericana. 2000.

Guerrier Y.,Guerrier B.,Lallemant J.G. Les évidements ganglionnaires cervicaux.Encyc.Méd.Chir.,Paris.Techniques chirurgicales,Thorax,2005 et 2006.4.7.12.

Halsted WS. The operative story of goiter. Johns Hopkins Hospital, 1920. Reeditado en Halsted WS. Surgical papers. Baltimore: The Johns Hopkins Press, (volume II): 257. 1928.

Hamilton TE, Van Belle G, Lo Gerf JP. Thyroid neoplasia in Marshall Islanders exposed to nuclear fallout. JAMA; 258(5): 629-635. 1987.

Hanna FW, Ardill JE, Johnston CF et al. Regulatory peptides and other neuroendocrine markers in medullary carcinoma of the thyroid. J Endocrinol; 152(2): 275-281. 1997.

Harl-El G, Hadar T, Segal K, Levy R, Sidi J. Hurthle cell carcinoma of the thyroid gland. A tumor of moderate malignancy. Cancer 57(8): 1613-1617. 1986.

Harrison TS. Tiroides. En: Sabinston DC, ed, Tratado de Patología Quirúrgica. Bases Biológicas de la práctica quirúrgica moderna (13ª edición en español). México: Editorial Interamericana-McGraw Hill, 617-632. 1988.

Harrison TR, Fauci A, Braunwald E, Isselbacher K, Wilson J, Martin J, Kasper DL, Hauser SL, Longo D. Principios de Medicina Interna. 14ªedición. Edit McGraw-Hill-Interamericana. 1998.

Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. Surgery;114:1050-7. 1993.

Hazard JB, Smith DE. The thyroid. Baltimore: Williams and Wilkins;288. 1964.

Hegedus L, Bonnema SJ, Bennedbaek FN. Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives. Endocr Rev. 24(1): 102-32. Review. Feb 2003.

Heitz P, Moser H, Staub JJ. Thyroid cancer: a study of 573 thyroid tumors and 161 autopsy cases observed over a thirty-year period. *Cancer* 37(5):2329-2337. 1997.

Hemminki K, Dong C. Familial relationships in thyroid cancer by histo-pathological type. *Int J Cancer* 8(2): 201-205. 2000.

Hendinguer C, Sobin LH. Histological type of thyroid tumors. En: *International Histological Classification of Tumors*. Ginebra: World Health Organization, 1974.

Hendiguer C, Williams ED, Sobin LH. The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. *Cancer* 63(5):908-911. 1989.

Henri de Martimprey, Jean-Remi Bertrand, Alfredo Fusco, Patrick Couvreur, Christine Vauthier, Claude Malvy. siRNA nanoformulation against the RET/PTC1 junction oncogene is efficient in an in vivo model pf papillary thyroid carcinoma. *Nucleic Acids Res.* 36(1): e2.January 2008.

Hidalgo M, Galan JJ, Sáez C, Ferrero E, Castilla C, Ramírez-Lorca R, Peláez P, Ruiz A, Japón MA, Royo JL. Methylation alterations are not a major cause of PTTG1 misregulation. *BMC Cancer.* 21;8:110. Apr 2008.

Hidalgo M, Saez ME, Martínez-Tello FJ, Morón FJ, Ferrero Herrero E, Labalde Martínez, Rigopoulou D, Ballestin Carcavilla C, Ruiz A, Royo JL, Ramírez Lorca R. Absence of allelic imbalance involving EMSY, CAPN5, and PAK1 genes in Papillary thyroid carcinoma. *J Endocrinol. Invest.* 2008

Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, Halperin E, Eskin E, Ballinger DG, et al. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science*; 307: 1072-9. 2005.

Hodgson NC, Button J, Solorzano CC. Thyroid cancer: is the incidence still increasing? *Ann Surg Oncol.* 11:1093-7. 2004.

Holzer S, Reiners C, Mann K et al. Patterns of care for patients with primary differentiated carcinoma of the thyroid gland treated in Germany during 1996. *Cancer* 89(1): 192-201. 2000.

Hughes-Davies L, Huntsman D, Ruas M, Fuks F, Bye J, Chin SF, et al. EMSY links the BRCA2 pathway to sporadic breast and ovarian cancer. *Cell* 115:523-35. 2003.

Huiling He, Krystian Jazdzewski, Wei Li, Sandya Liyanarachchi, Stefano Volinia, George A Calin, Chang-gong Liu, Kaarle Franss, Richard T Kloos, Carlo M Croce, Albert de la Chapelle. The Role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 27; 102(52): 19075-19080. December 2005.

Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53856 case of thyroid carcinoma treated in the US. *Cancer* 1998; 83(12): 2638-2648. 1985-1995.

Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP et al. Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the United States during 1996. *Cancer* 89(1): 202-217. 2000.

Ingrosso D, Cimmino A, Perna AF, Masella L, De Santo NG, De Bonis ML, Vacca M, D'Esposito M, D'Urso M, Galletti P, Zappia V. Folate treatment and unbalance methylation and changes of allelic expresión induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemi. *Lancet* 361:19693-1699. 2003.

Isaacson PG, Wright DH. Extranodal malignant lymphoma arising from mucosa-associated lymphoid tissue. *Cancer* 53(11):2515-2524. 1985.

Ito Y, Tomoda C, Uruno T, et al. Papillary microcarcinoma of the thyroid: how should it be treated? *World J Surg* 28(11):1115-1121. 2004.

Jacob P, Goulko G, Heidenreich WF, et al. Cancer mortality following treatment for adult hyperthyroidism. *JAMA* 280:347-355. 1998.

James A Fagin. Genetics of Papillary Thyroid Cancer Initiation: Implications for Therapy. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 116:259-271. 2005.

Jemal A, Siegel, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. *Ca Cancer J Clin* 56(2):106-30. 2006.

Jin Y, Höglund M, Jin C, et al. FISH characterization of head and neck carcinomas reveals that amplification of band 11q13 is associated with deletion of distal 11q. *Genes Chromosomes Cancer*, 22:312-20. 1998.

Joseph Kim, Armando E. Giuliano, Roderick R, Turner R, Gaffney, Naoyuki Umetani, Minoru Kitago Elashoff, Dave S. B. Hoon. Lymphatic Mapping Establishes the Role of BRAF Gene Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma. *Ann Surg*. 244(5):799-804. Nov 2006.

Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 24(14):2137-50. 2006.

Kaplan E.L. Tiroides y paratiroides. En: Schwartz SI, ed, *Principios de Cirugía*. México: Editorial Interamericana, 1537-1626. 1987.

Kebebew E, Ituarte PH, Siperstein AE, et al. Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. *Cancer* 88(5): 1139-48. 2000.

Kennedy GC, Matsuzaki H, Dong S, Liu WM, Huang J, Liu G et al. Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol* 21:1233-7. 2003.

Kim TY, Kim WB, Rhee YS, Song JY, Kim JM, Gong G, Lee S, Kim SY, Kim SC, Hong SJ, Shong YK. The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 65(3): 364-8. Sep 2006.

Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforova YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signalling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 16:1454-7. 2003.

King MC. A novel BRCA2-binding protein and breast and ovarian tumorigenesis. *N Engl J Med* 350:1252-3. 2004.

Kinzler Kw, Vogelstein B. The genetic basis of human cancer, 2nd ed. Toronto: McGraw-Hill, 2002.

Klug WS, Cummings MR. Conceptos de Genética . Ed Prentice Hall Iberia. 5ªed.1998.

Komminoth P. The RET proto-oncogene in medullary and papillary thyroid carcinoma. Molecular features, pathophysiology and clinical implications. Virchows Arch 431(1):1-9. 1997.

Kondo T, Asa SL, Ezzat S. Epigenetic dysregulation in thyroid neoplasia. Endocrinol Metab Clin North Am. 37(2):389-400.Jun 2008.

Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Boubier Y, Charo C, Yamochi T, Urano T, Furukawa K, et al. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. Nat Genet 40:741-750. 2008.

Korff JM, DeGroot LJ. The management of radiation induced tumors of the thyroid. Clin Endocrinol Metab 10(2):299-315. 1981.

Kraimps JL, Bouin Pineau MH, Amati P, Mothes D, Bonneau D, Marechaud R. Familial papillary carcinoma of the thyroid. Surgery 121(6):715-718. 1997.

KrollTG, Sarraf P, Pecciarini L, et al. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. Science 289(5483):1357-60. 2000.

Kuçük NO, Tari P, Tokman E, Aras G. Treatment for microcarcinoma of the thyroid-clinical experience. Clin Nucl Med. 32(4):279-81. Apr 2007.

Kung IT: Distinction between colloid nodules and follicular neoplasms of the thyroid. Further observation of cell blocks. Acta Cytol; 26:793-796. 1982.

Kuo SF, Chao TC, Hsueh C, Chuang WY, Yang CH, Lin JD. Prognosis and Risk Stratification in Young Papillary Thyroid Carcinoma Patients. Endocr J. Mar 25. 2008.

Kurkuti S, Tiwari VK, Tavoosidana G, Pugacheva E, Murrell A, Zhao Z, Lobanenko V, Reik W, Ohlsson R. CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:10648-10689. 2006.

Kymberly A, Placzkowski, Honey V. Reddi, Stefan K. G. Grebe, Norman L. Eberhardt, and Bryan McIver. The Role of the PAX8/PPAR γ Fusion Oncogene in Thyroid Cancer. *PPAR Res*. 2008.

La Quaglia MP, Black T, Holcomb GW et al. Differentiated thyroid cancer: clinical characteristics, treatment and outcome in patients under 21 years of age who present with distant metastases. *J Pediatr Surg* 35(6): 955-9. 2000.

Lal G, Padmanabha L, Smith BJ, Nicholson RM, Howe JR, O'Dorisio MS, Domann FE Jr. RIZ1 is epigenetically inactive by promoter hypermethylation in thyroid carcinoma. *Cancer*. 107(12):2752-9. Dec 2006.

Lang B, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Wan KY. Restaging of differentiated thyroid carcinoma by the sixth edition AJCC/UICC TNM staging system: Stage migration and predictability. *Ann Surg Oncol*, 14(5):1551-1559. 2007.

Langer P. El bocio endémico. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; Serie de Monografías de la O.M.S, 44:9. 1961.

Latarjed M.; Ruiz Liard A. Cuerpo o Glándula Tiroides (Pág. 1839-1852). Ed. Médica panamericana. Anatomía Humana. Tomo II. 1983

Latarjed M.; Ruiz Liard A. Glándula paratiroides (pag1853- 1855). Ed. Médica panamericana. Anatomía Humana. Tomo II. 1983.

Lee JH, Lee ES, Kim YS, Won NH, Chae YS. BRAF mutation and AKAP9 expression in sporadic papillary thyroid carcinomas. *Pathology*. 38(3): 201-4. Jun 2006.

Leight GG: Nodular goiter and benign and malignant neoplasms of the thyroid. In Sabiston DC, Lyerly HK, (ed): "Textbook of surgery: the biological basis of modern surgical practice". Pennsylvania, PA: WB Saunders. P. 626-637. 1997.

Lemos MC, Carrilho F, Rodrigues F, Countinho E, Gomes L, Carneiro M, Regateiro FJ. Genetic polymorphism of CYP2D6 influences susceptibility to papillary thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 67(2): 180-3. Aug 2007.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396:643-9. 1998.

Lesueur F, Corbex M, McKay JD, et al. Specific haplotypes of the RET proto-oncogene are over-represented in patients with sporadic papillary thyroid carcinoma. *J Med Genet*, 39:260-5. 2002.

Lindor NM, Greene MH. The concise handbook of family cancer syndromes. Mayo Familial Cancer Program. *J Natl Cancer Inst* 90(14):1039-71. 1998.

Links TP, Links TP, Van Tol KM, Jager PL, Plukker JThM, Piers DA, Boezen HM, et al. Life expectancy in differentiated thyroid cancer: a novel approach to survival analysis. *Endocrine-related Cancer*. 12:272-80. 2001;86:5686-90. 2005.

Little JB. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21(3): 397-404. 1999.

Livingston DM. EMSY, a BRCA-2 partner in crime. *Nat med* 10:127-8. 2004.

Lohrs U. Carcinoma papilar. Aspectos morfológicos, epidemiológicos y biológicos. *Patología* 18:129-138. 1985.

Lohrs U, Permanetter W, Spelsberg F, Beiting M. Das schilddrüsen-carcinoma in bayerischen struma-endemiegebiet. *Klin Wochenschr* 58(8):415-424. 1980.

Lohrs U, Spelsberg F, Schubert C, Petscher R, Permanetter WP. Thyroid carcinoma in the barbarian endemic goitre area. Investigation of frequency of histological types, tumor stages and prognosis. *Acta Endocrinol Suppl (Copen)*; 252:102-26. 1983.

Lucas A. Enfermedad nodular tiroidea. Diagnóstico y tratamiento. *Med Clin*; 114:11-184, 2000.

Luster M, Lippi F, Jarzab B, Perros P, Lassmann M, Reiners C, et al. rhTSH-aided radioiodine ablation and treatment of differentiated thyroid carcinoma: a comprehensive review. *Endocrine-related Cancer*. 12:49-64. 2005.

Machens A., Hinze R., Lautenschlager C., Thomusch O., Dralle H. Thyroid carcinoma invading the cervicovisceral axis: routes of invasion and clinical implications. *Surgery* 129:23-28, 2001.

Machens A, Holzhausen HJ, Dralle H. The prognostic value of primary tumor size in papillary and follicular thyroid carcinoma. *Cancer*. 103:2269-73. 2005.

Marcos A, Ferrero E, Moreno N, Lázaro J, Peláez P, Sánchez de Pedro F, Guadarrama FJ, Butrón T, Ramos R, Pascual A, Hidalgo M. Nódulo tiroideo. Evaluación clínico-funcional, pruebas de imagen y tratamiento quirúrgico. *Cir Andaluza Vol.14 Número 1*:14-19. Marzo 2003.

Martin C, Zhang Y. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol*. 19(3):266-72. Jun 2007.

Martínez Rodríguez E, Suárez Nieto C, San Miguel Botella P. Epidemiología del cáncer de tiroides en Asturias. *Cir Esp*; 40:667-673. 1986.

Matsuo K, Tang SH, Fagin JA. Allelotype of human thyroid tumors: loss of chromosome 11q13 sequences in follicular neoplasm. *Mol Endocrinol*, 5:1873-9. 1991.

Matsuzuka F, Miyauchi A, Katayana S et al. Clinical aspects of primary thyroid lymphoma: diagnosis and treatment based on our experience of 119 cases. *Cancer*; 66:321-330. 1990.

Mato A, Gippini A, Peino R, Ganoso P, Uriel B. Carcinoma diferenciado de tiroides en un área de bocio endémico. Estudio clínico y correlación pronóstica. *An Med Interna*; 13(11): 537-540. 1996.

Mazaferri EL. Management of low-risk differentiated thyroid cancer. *Endocr Pract*. 13(5):498-512. Sep 2007.

Mazzaferri EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med*; 328:553-559, 1993

Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med*. 49:418-28. 1994.

Mazzaferri EL, Samaan N. Thyroid carcinoma: Papillary and Follicular. *Endocrine Tumors Cambridge: Blackwell Scientific Publication*: 278-333. 1993.

Mazzarotto R, Cesaro MG, Lora O, Rubello D, Casara D, Sotti G. The role of external beam radiotherapy in the management of differentiated thyroid cancer. *Biomed Pharmacother*. 54:345-9. 2000.

Mc Clellan DR, Francis GL, Thyroid Cancer in children, Pregnant women, and patients with Graves Disease. *Endocrinol Metab Clin North Am*; 25:27-48. 1996.

Mc Conahey WM, Hay ID, Woolner LB, van Heerden JA, Taylor WF. Papillary Thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy and outcome. *Mayo Clinic Proc*; 61(12): 978-996. 1986.

McGriff NJ, Csako G, Gourgiotis L, Lori CG, Pucino F, Sarlis NJ. Effects of thyroid hormone suppression therapy on adverse clinical outcomes in thyroid cancer. *Ann Med*. 34:554-64. 2002.

Mc Iver B, Grebe SK, Eberhardt NL. The PAX8/PPAR gamma fusion oncogene as a potential therapeutic target in follicular thyroid carcinoma. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*;4(3): 221-34. 2004.

Medeiros GA, Lima N, Knobel M, Cavaliere H et al. Clinical aspect and diagnostic procedures related to thyroid carcinoma in an endemic goitre area. *Acta Endocrinol*; 252(sup):102-120. 1983.

Mishra A, Mishra SK, Agarwal A et al: Metastatic differentiated thyroid carcinoma: clinicopathological profile and outcome in an iodine deficient area. *World J Surg* 26:153-157. 2002.

Moreno N, Ferrero E, Lázaro J, Peláez P, Marcos A, Sánchez de Pedro F, Guadarrama FJ, Hijas E, Hidalgo M. Cáncer diferenciado de tiroides. Tratamiento quirúrgico y seguimiento postoperatorio. Cirugía Andaluza Vol. 14, Número 1, (33-39). Marzo 2003.

Mornex R. Histoire du goitre et du cretinismo. Conferences d'histoire de la Medicine. Lyon, cycle. Pags 103-114. 1998-1999.

Musholt T, Musholt PB, Petrich T, Oetting G, Knapp WH, Klempnauer J. Familial papillary thyroid carcinoma: genetics, criteria for diagnosis, clinical features, and surgical treatment. World J Surg, 24: 1409-17. 2000.

Nagataky S, Nystrom E. Epidemiology and primary prevention of thyroid cancer. Thyroid;12(10):889-96. 2002.

Nagy R, Sweet K, Eng C. Familial penetrant hereditary cancer syndromes. Oncogene;23(38): 6445-70. 2004.

Nakhjavani MK, Gharib H, Goellner JR, Van Heerden JA. Metastasis to the thyroid gland. A report of 43 cases. Cancer; 79(3); 574-8. 1997.

Namba H, Yamashita S. Gene abnormalities in thyroid cancer. Nippon Rinsho. 65(11):1967-72. Nov 2007.

Negri E, Ron E, Franceschi S, et al. A pooled análisis of case-control studies of thyroid cancer. I Methods. Cancer Causes Control;10(2):131-42. 1999.

Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, et al. PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. Am J Surg Pathol;26(8):1016-23. 2002.

Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, et al. RAS point mutations and PAX8-PPARgamma rearrangements in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. J Clin Endocrin Metab;88(5):2318-26. 2003.

Noguchi S.,Murakami N. The value of lymph-node dissection in patients with differentiated thyroid cancer. *Surg.Clin.North.Am.* 67:251-261,1987.

O'Meara D, Ahmadian A, Oderberg J, Lundeberg J. SNP typing by a pyrase-mediated allele-specific primer extension on DNA microarrays. *Nucleic Acids Res*; 30:e75. 2002.

Oertel YC. Fine-needle aspiration and the diagnosis of thyroid cancer. *Endocrin Metab Clin North Am*; 25:69-91, 1996.

Ohshima A, Yamashita H, Noguchi S et al: Indications for bilateral modified radical neck dissection in patients with papillary carcinoma of the thyroid. *Arch Surg* 135: 1194-1199. 2000.

Onyago P. Genomics and cancer. *Curr Opin Oncol*;14:79-85. 2002.

Ozata M, Suzuki S, Miyamoto T, et al: Serum thyroglobulin in the follow-up of patients with treated differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*: 79; 98-105. 1994.

Paccini F, Bassolo F, Elisei R, Fugazzola L, Cola A, Pinchera A. Medullary thyroid cancer. An Immunohistochemical and humoral study using six separate antigens. *Am J Clin Pathol*; 95(3):300-308. 1991.

Pacini et al. Consenso europeo sobre el carcinoma diferenciado tiroideo. *Endocrinol Nutr.* 54(7): e1-e16. 2007.

Paccini F et al. Consenso europeo, the European thyroid cancer task force. *Eur J Endocrinol.* 14:787-803. 2006.

Pacini F, Burrioni L, Ciuli C, Di Cairano G, Guarino E. Management of thyroid nodules: a clinicopathological, evidencebased pproach. *Eur J Nuclear Med Mol Imaging.* 31:1443-9. 2004.

Papait R, Monti E, Bonapace IM. Novel approaches on epigenetics. *Curr Opin Drug Discov Devel.*12(2):264-75. Mar 2009.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisan P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 55(2): 74-108. 2005.

Pascual MH, Royo JL, Martínez-Tello FJ, Crespo C, Salinas A, Ferrero Herrero E, López-García M, Real LM, Ruiz A, Ramírez-Lorca R. Exploring allelic imbalance within paraffin-embedded tumor biopsias using pyrosequencing technology. *Clin Chem Lab Med*; 44(9). 2006.

Patiño JF. *Bocio y Cáncer de Tiroides*. Colombia: Fondo Educativo Interamericano :13. 1976.

Pelizzo MR, Boschini IM, Toniato A, Piotto A, Bernate P, Pagetta C, Rampin L, Rubello D. Papillary Thyroid microcarcinoma (PTMC): prognostic factors, management and outcome in 403 patients. *Eur J Surg Oncol.* 32(10): 1144-8. Dec 2006.

Pelizzo MR, Boschini IM, Pagetta C, Piotto A, Bernate P, Casara D, Pennelli G, Rubello D. Natural history, diagnosis, treatment and outcome of papillary thyroid microcarcinoma (PTMC): a mono-institutional 12-year experience. *Nucl Med Commun.* 25(6):547-52. Jun 2004.

Pembrey ME, Bygren LO, Kaati G, Edvinsson S, Northstone K, Sjöström M, Golding J. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur J Hum Genet* 14:159-166. 2006.

Pera C. *Cirugía. Fundamentos, indicaciones y opciones técnicas*. Barcelona: Salvat Editores, 1268-1280. 1991.

Pielberg G, Day AE, Plastow GS, Andersson L. A sensitive method for detecting variation in copy numbers of duplicated genes. *Genome Res.* 13:2171-7. 2003.

Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer*;83(1): 18-29. 1999.

Pluijmen MJ, Pluijmen MJ, Eustatia-Rutten C, Goslings BM, Stokkel MP, Arias AM, Diamant M, et al. Effects of low-iodide diet on postsurgical radioiodide ablation

therapy in patients with differentiated thyroid carcinoma. Clin Endocrinol (Oxford). 58:428-35. 2003.

Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. Nat Rev Mol Cell Biol. 10(3):192-206. Mar 2009.

Puñal Rodríguez JA, Barreiro Morandeira F, Beiras Torrado A. Linfoma del Tiroides. Cir Esp; 40:1151-1160. 1986.

Puzianowska-Kuznicka M, Pietrzak M. Endokrynol Pol. 56(3): 339-45. Genetic Factors predisposing to the development of papillary thyroid cancer. May-Jun 2005.

Ramírez-Lorca R, E Ferrero Herrero, ME , M Labalde Martinez, LM Real, A Ruiz & M Hidalgo Pascual. Loss of heterozygosity and genetic association analyses within 11q13.5-q14 chromosomal region in papillary thyroid carcinoma. *Endocrine Abstracts* 11 P791. 2006.

Reverter JL, Lucas A, Audi L. Supresión therapy with levothyroxine for solitary nodules. Clin Endocrinol; 36:25-28, 1992.

Reyes Cerezo M, Varo Pérez E, Del Castillo Maza A et al. Cáncer de tiroides: a propósito de 19 casos. Cir Esp;39(1): 86-90. 1985.

Riccabona G, Ladurner D, Steiner E. Changes in thyroid surgery during iodine prophylaxis of endemic goiter. World J Surg; 7(2): 195-200. 1983.

Riddle PE, Dincsoy HP. Primary squamous cell carcinoma of the thyroid associates with leukocytosis and hypercalcemia. Arch Pathol Lab Med; 111(4):373-374. 1987.

Ridway EC. Clinician's evaluation of a solitary thyroid nodule. J Clin Endocrinol Metab; 74:231.235, 1992.

Robbins J, Merino MJ, Boice JD et al. Thyroid cancer: a lethal endocrine neoplasm. Ann Intern Med; 115(2):133-147. 1991.

Robbins RJ, Wan Q, Grewal RK, Reibke R, Gonen M, Strauss HW, et al. Real-time prognosis for metastatic thyroid carcinoma based on FDG-PET scanning. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:498-505. 2006.

Robbins SL, Cotrand RD, Kumar V. Glándula tiroides. *Patología estructural y funcional* (5ª edición en castellano). Madrid; Editorial Interamericana-McGraw-Hill, 1995.

Rodríguez Carballeira M, Coll Roldua I, Del Pozo Pico C, Soler Rich R, García Pascual L, Balseéis Coca M. Cancer folicular de tiroides de presentación atípica. *An Med Interna*; 12(6): 291-293. 1995.

Rodríguez FJC, Limbert ES, Marques AP, Santos AP, Lopes C, Rodrigues E, et al. Thyroid Study Group. Protocol for the treatment and follow-up of differentiated follicular thyroid carcinomas. *Portuguese Medical Minutes*.;18:2-16. 2005.

Rodríguez C, Hughes-Davies L, Valles H, Orsetti B, Cuny M et al. Amplification of the BRCA2 pathway gene EMSY in sporadic breast cancer is related to negative outcome. *Clin Cancer Res*;10:5785-91. 2004.

Rodríguez-Serpa A, Catarino A, Soares J. Loss of heterozygosity in follicular and papillary thyroid carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 141:26.31. 2003.

Rogounovitch TI, Saenko VA, Ashizawa K, et al. TP53 codon 72 polymorphism in radiation-associated human papillary thyroid cancer. *Oncol Rep*;15(4): 949-56. 2006.

Ron E, Lubin JH, Shore RE, et al. Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. *Radiat Res*;141(3):259-77. 1995.

Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrosequencing. *Science*;281:363-5. 1998.

Rossi R.; Blake C.;. *Surgical Anatomy* (pag 13-30). WB Saunder Company. Surgery of de thyroid and parathyroid glands. 1997.

Royo JI, Hidalgo Pascual M, Salinas A, Martínez-Tello FJ, Rivero MC, Ferrero Herrero E, Real LM, Ruiz A. Pyrosequencing protocol requiring a unique biotinilated primer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*; 44(4):435-41.2006.

Rubino C, De Vathaire F, Dottorini ME, Hall P, Schwartz C, Couette JE, et al. Second primary malignancies in thyroid cancer patients. *Br J Cancer*.;89:1638-44. 2003.

Ruiz A, Antinolo G, Fernández RM, Eng C, Marcos I, Borrego S. Germline sequence variant S836S in the RET proto-oncogene is associated with low level predisposition to sporadic medullary thyroid carcinoma in the Spanish population. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 55(3): 399-402. Sep 2001.

Rusinek D, Gubala E. BRAF initiating mutations in the papillary thyroid carcinoma. *Endokrynol Pol*. 57(4): 438-44. Jul-Aug 2006.

Russell MA, Gilbert EF, Jaeschke WF: prognostic features of thyroid cancer. Long-term follow-up of 68 cases. *Cancer* 36: 553-559; 1975.

Saavedra Vallejo MP, Dómine M, Santana A, Álvarez Escolá C, Álvarez-Mon M. Cancer de tiroides. Carcinoma diferenciado, pobremente diferenciado y anaplásico. Linfoma tiroideo, otros tumores malignos tiroideos. Etiopatogenia y manifestaciones clínicas. *Medicine*; 7(44):1944-1953. 1997.

Sadler GP, Clark OH, Van Heerden JA, Parley DR. *Tiroides y Paratiroides*. Mexico: McGraw-Hill Interamericana, 1788-1802. 1999.

Sadler T. W. *Embriología de la cabeza y cuello* (Pág. 283-311). Editorial Panamericana. Langmann *Embriología Médica*. 1986.

Saito K, Kuratomi Y, Yamamoto K et al. Primary squamous cell carcinoma of the thyroid associated with marked leukocytosis and hypercalcemia. *Cancer*; 48(9): 2080-2083. 1981.

Sakorafas GH, Giotakis J, Stafyla V. Papillary throid microcarcinoma: a surgical perspective. *Cancer Treat Rev*. 31(6):423-38. Oct 2005.

Samaan Na, Ordoñez G. Uncommon types of thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North A*; 19:637-648. 1990.

Samaann Na, SchultzPN, Haynie TP, Ordenez NG. Pulmonary metastases of differentiated thyroid carcinoma: treatment results I 101 patients. *J Clin Endocrinol Metab*; 60(2): 376-380. 1985.

Samaann Na, SchultzPN, Hickey RC, et al: The results of various modalities of treatment of well differentiated thyroid carcinomas: a retrospective review of 1599 patients. *J Clin Endocrinol Metab*; 75:714-720. 1992.

Sampson RJ, Key CR, Buncher CR. Thyroid carcinoma in Hiroshima and Nagasaki I. Prevalence of thyroid carcinoma at autopsy. *JAMA*.;209(1):65-70. 1969.

Samuel AM, Rajashekharrao B, Shah DH. Pulmonary metastases in children and adolescents with well-differentiated thyroid cancer. *J Nucl Med*;39: 1531-1536. 1998.

Sanders L.; Blake C.;. Embryology and developmental abnormalities.(pag 5-12) WB Saunder Company. Surgery of de thyroid and parathyroid glands. 1997.

Santamaria J, Vazquez JA. Valoración de métodos diagnósticos en el estudio del nódulo tiroideo. *Endocrinología*; 33:46-50. 1986.

Sarda AK, Kapur MM. Thyroid carcinoma. A report of 206 cases from an area with endemic goitre. *Acta Oncol*; 29(7): 863-867. 1990.

Sawka AM Thephamongkhol K, Brouwers M, Thabane L, Browman G, Gerstein HC. Clinical review 170: a systematic review and metaanalysis of the effectiveness of radioactive iodine remnant ablation for well-differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 89:3668-76. 2004.

Schaller RT, Stevenson JK. Development of carcinoma of the thyroid in iodine-deficient mice. *Cancer*;19:1063-1080. 1966.

Schneider AB, Bekerman C, Leland J et al. Thyroid nodules in the follow-up of irradiated individuals: Comparison of thyroid ultrasound with scanning and palpation. *J Clin Endocrinol Metab*; 82:4020-4027. 1997.

Schlumberger MJ. Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med*;338(5): 297-306. 1998.

Schlumberger M, Berg G, Cohen O, Duntas L, Jamar F, Jarzab B, et al. Follow-up of low-risk patients with differentiated thyroid carcinoma: a European perspective. *Eur J Endocrinol*;150:105-12. 2004.

Schraml P, Schwerdtfeger G, Burkhalter F, Raggi A, Schmidt D, Ruffalo T et al. Combined array comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis suggest PAK1 at 11q13.5-q14 as a critical oncogene target in ovarian carcinoma. *Am J Pathol*;163:985-92. 2003.

Schuuring E. The involvement of the chromosome 11q13 region in human malignancies: cyclin D1 and EMS1 are two new candidate oncogenes-a review. *Gene*, 159:83-96. 1995.

Sedgwick CE. Cirugía del Tiroides. Barcelona: Editorial Científico Médica, 1978.

Selzer G, Kahn LB, Albertyn L. Primary malignant tumors of the thyroid gland: a clinicopathologic study of 254 cases. *Cancer*;40(4):1501-1510. 1977.

Sherman SI. SI. Thyroid carcinoma. *Lancet*;361(9365):501-11. 2003.

Sherman SI, Brierley JD, Sperling M et al. Prosective multicenter study of treatment of thyroid carcinoma: Initials analysis of staging and outcome. *Cancer*; 83:1012-1021. 1998.

Shih IM, Wang TL. Apply innovative Technologies to explore cancer genome. *Curr Opin Oncolo*; 17:33-8. 2004.

Shimamoto, Satake H, Sawaki A, Ishigaki T, Funahashi H, Imai T. Preoperative staging of thyroid papillary carcinoma with ultrasonography. *Eur J Radiol*.

1998;29:4-10. of well differentiated thyroid carcinomas: a retrospective review of 1599 patients. J Clin Endocrinol Metab. 1992;

Simpson WJ, Carruthers J. Squamous cell carcinoma of the thyroid gland. Am J Surg; 156(1): 44-46. 1988.

Sitges-Serra A, Sancho JJ. Cirugía endocrina, Arán Ediciones 1999.

Sivanandan R, Soo KC. Pattern of cervical lymph node metastasis in papillary carcinoma of the thyroid. Br J Surg 88: 1241-1244. 2001.

Sobrinho-Simoes M, Preto A, Rocha AS, et al. Molecular pathology of well-differentiated thyroid carcinomas. Virchows Arch;447(5):787-93. 2005.

Sosa JA, Udelsmann R. Papillary thyroid cancer. Surg Oncol Clin N Am. 15(3): 585-601. Jul 2006.

Suchy B, Waldmann V, Klugbauer S, Rabes HM. Absence of RAS and p53 mutations in thyroid carcinomas of children after Chernobyl in contrast to adult thyroid tumours. Br J Cancer;77(6):952-5. 1998.

Suijkerbuijk KP, van der Wall E, van Laar T, Vooijs M, van Diest PJ. Epigenetic processes in malignant transformation: the role of DNA methylation in cancer development. Ned Tijdschr Geneesk. 151(16): 907-13. Apr21 2007.

Süskind A. Ueber die Estirpation von Strume. Inaugural-Abhandlung. Tübingen, 1877.

Torlontano M, Attard M, Crocetti U, Tumino S, Bruno R, Costante G, et al. Follow-up of low risk patients with papillary thyroid cancer: role of neck ultrasonography in detecting lymph node metastases. J Clin Endocrinol Metab. 89: 3402-7. 2004.

Tsang RW, Brierley JD, Simpson WJ, et al. The effects of surgery, radioiodine, and external radiation therapy on the clinical outcome of patients with differentiated thyroid carcinoma. Cancer 82:375-388; 1998.

Trattamento e Follow up del Carcinoma Tiroideo Differenziato Della Tiroide. Linee Guida SIE-AIMN-AIFM; p. 1-75. 2004.

Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter Km, Smith AN, Di Genova G, et cols. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*;423(6939):506-11. Epub 2003 Apr 30. May 2003.

Van De Velde CJH, Hamming JF, Goslings BM, Schelfout LJD, Clark OH, Smeds A, et al. Report of the consensus development conference on the management of differentiated thyroid cancer in The Netherlands. *Eur J Cancer Clin Oncol*;24:287-92. 1988.

Van Goethem G, Dermaut B, Löfgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation of POLG is associated with progressive external opthalmoplegia characterized bby mtDNAdeletions. *Nat Genet*;28:211-2. 2001.

Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, de micco C. Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 88:2745-52. 2003.

Venkatesh YS, Ordoñez NG, Schultz PN, Hickey RC, Goepfert H, Samaan NA. Anaplastic thyroid carcinoma. A clinico-pathology study of the 121 cases. *Cancer*; 66: 321-330. 1990.

Vickery AL, Carcangiu ML, Johannessen JV, Sobrihnh-Simoes M. Papillary carcinoma. *Semin Diagn Pathol*; 2(2):90-100. 1985.

Villagrasa López E, Villalobos Talero JA, Camacho Marín MD, Mazure Lenhoff RA, Marqués Melero E, Domínguez García M. Cáncer de tiroides. Análisis de nuestra serie. *Cirugía andaluza*; 1(1): 9-14. 1990.

Visset J, Hamy A, Mirallie E, Paineau J. Locoregional recurrence of differentiated thyroid cancers: diagnosis-treatment. *Ann Chir* 127:35-39. 2002.

Vorländer C, Lienenlücke RH, Wahl RA. Lymph node dissection in papillary and follicular thyroid cancer. *Chirurg*. Mar 5 2008.

Wada N, Yoshida A, Miyagi Y, Yamamoto T, Nakayama H, Suganuma N, Matsuku K, Masudo K, Kirakawa S, Rino Y, Masuda M, Imada T. Overexpression of the mitotic spindle assembly checkpoint genes hBUB1, hBUBR1 and hMAD2 in thyroid carcinomas with aggressive nature. *Anticancer Res.* 28(1): 139-44. Jan-Feb 2008.

Wang Y, Ji M, Wang W, Miao Z, Hou P, Chen X, Xu F, Zhu G, Sun X, Li Y, COndouris S, Liu D, Yan S, Pan J, Xing M. Association of the T17994 BRAF mutation with tumor extrathyroidal invasion, higher peripheral platelet counts, and over-expression of platelet-derived growth factor-B in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 15(1):183-90. Mar 2008.

Wang C.A. The anatomic basis of parathyroid surgery. *Ann Surg.* 183:271-275. 1976.

Werner Vasik M, Schmid CH, Bornstein LE, Madoc Jones H. Increased risk of second malignant neoplasms outside radiation fields in patients with cervical carcinoma. *Cancer;* 75(9):2281-2285. 1995.

Werner SC, Ingbar SH. *El Tiroides*. Bcelona: Editorial Salvat, 1977:5.

Williams ED. Thyroid tumorigenesis. *Horm Res;* 42(1-2):31-34. 1994.

Winship T, Rosvoll RV. Childhood thyroid carcinoma. *Cancer;*14: 734-743. 1961.

Witekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH. TNM residual tumor classification revisited. *Cancer.* 94:2511-6. X-rays. *J Nuclear Med.* 1988;29:1790-4. 2002.

Wong FL, Ron E, Gierlowski T et al. Benign thyroid tumors: general risk factors and their effects on radiation risk estimation. *Am J Epidemiol;* 144:728-733. 1996.

Woolner LB, Bears OH, Black BM, McConahey WM, Keating FR. Classification and prognosis of thyroid carcinoma: a study of 885 observed cases in a thirty year period. *Am J Surg;* 102: 354-387. 1961.

Wozniak A, Wiench M, Olejniczak A, et al. loss of heterozygosity in 73 human thyroid tumors. *Neuro Endocrinol lett,* 26:521-5. 2005.

Wreesmann VB, Ghossein RA, Patel SG, et al. Genome-wide appraisal of thyroid cancer progression. *Am J Pathol*, 161:1549-56. 2002.

Wreesman VB, Sieczka EM, Socci ND, et al. Genome-wide profiling of papillary thyroid cancer identifies MUC1 as an independent prognostic marker. *Cancer Res*, 64:3780-9. 2004.

Wymfor-Thomas D. Molecular and genetics of thyroid cancer (Rev). *Curr Opin Endocrinol Diabetes*. 2:429-436. 1995.

Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocrin Rev*. 28(7):742-62. Dec 2007.

Xing M. Recent advances in molecular biology of thyroid cancer and their clinical implications. *Otolaryngol Clin North Am*. 41(6):1135-46. Dec 2008.

Xing M. Gene methylation in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology*. 148(3): 948-53. Mar 2007.

Yang GC, Liebeskind D, Messina AV. Ultrasound-guided fine-needle aspiration of the thyroid assessed by Ultrafast Papanicolaou stain: data from 1135 biopsies with a two to six year follow up. *Thyroid* 11(6): 581-9. 2001.

Yin X, Latif R, Tomer Y, Davies TF. Thyroid epigenetics: X chromosome inactivation in patients with autoimmune thyroid disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1110:193-200. Sep 2007.

Ylstra B, van den Ijssel P, Carvalho B, Brakenhoff RH, Meijer GA. BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic Acids Res*; 34:445-50. 2006.

Zettinig G, Fueger BJ, Passler C, Kaserer K, Pirich C, Dudczak R, et al. Long-term follow-up of patients with bone metastases from differentiated thyroid carcinoma – surgery or conventional therapy? *Clin Endocrinol (Oxford)*. 56:377-82. 2002.

Zilberman D, Henikoff S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development* 134: 3959-3965. 2007.

Zhou X, Li C, Mok S, Chen Z, Wong DT. Whole genome loss of heterozygosity profiling on oral squamous cell carcinoma by high-density single nucleotide polymorphic allele (SNP) array. *Cancer Genet Cytogenet*;151:82-4. 2004.

Zhou X, Mok SC, Chen Z, Li Y, Wong DT. Concurrent analysis of heterozygosity (LOH) and copy number abnormality (CNA) for oral premalignancy progression using the Affymetrix 10K SNP mapping array. *Hum Genet*; 115:327-30. 2004.

Zhou X, Rao NP, Cole SW, Mok SC, Chen Z, Wong DT. Progress in concurrent analysis of loss of heterozygosity and comparative genomic hybridization utilizing high density single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Genet Cytogenet*;159:53-7. 2005.

Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, Gandhi M, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab*, 91:3603-10. 2006.

Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol*, 120:71-7. 2003.